

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1935-1936

N° 11

DE L'INFLUENCE EXERCÉE
SUR LE DÉVELOPPEMENT
DES GERMES DE LUPIN
PAR
UNE SOLUTION ALCALOÏDIQUE
(Contribution à l'étude des altérations
des solutions de chlorhydrate de cocaïne)

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1937

PAR

Robert JORIOT

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris.

JURY

} MM. H. COUTIÈRE, *Président.*
P. GUÉRIN, *Professeur.*
J. RÉGNIER, *Agrégé.*

PARIS
ÉTABLISSEMENTS BUSSON
117, RUE DES POISSONNIERS (18°)

1937



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1935-1936

N° 11

DE L'INFLUENCE EXERCÉE
SUR LE DÉVELOPPEMENT
DES GERMES DE LUPIN
PAR
UNE SOLUTION ALCALOÏDIQUE
(Contribution à l'étude des altérations
des solutions de chlorhydrate de cocaïne)

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1937

PAR

Robert JORIOT

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris.

JURY { MM. H. COUTIÈRE, *Président.*
P. GUÉRIN, *Professeur.*
J. RÉGNIER, *Agrégé.*

PARIS
ÉTABLISSEMENTS BUSSON
117, RUE DES POISSONNIERS (18°)

1937

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, *Doyen*, O. ✱, ☼ I.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱, ☼ I.
P. DESPORT, *Secrétaire*, ✱, ☼ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, O. ✱, ☼ I. Botanique générale.
PERROT, C. ✱, ☼ I. Histoire naturelle des médicaments.
COUTIÈRE, O. ✱, ☼ I. Zoologie.
LEBEAU, O. ✱, ☼ I. *membre de l'Institut*. Pharmacie chimique.
BOUGAULT, O. ✱, ☼ I. Chimie analytique.
GORIS, O. ✱, ☼ I. Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. ✱, ☼ I. Physique.
DAMIENS, ✱, ☼ I. Chimie générale.
HÉRISSEY, O. ✱, ☼ I. Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☼ I. Chimie organique.
LUTZ, ✱, ☼ I. Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ☼ I. Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ☼ I. Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ☼ I.

Professeurs honoraires : MM. BÉHAL, G. O. ✱, ☼ I.
et DELÉPINE, O. ✱, ☼ I., membres de l'Institut, et GUERBET, ✱, ☼ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, ✱, ☼ I. Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. ✱, ☼ I. Pharmacodynamie.
DELABY, ✱, ☼ I. Hydrologie et Hygiène.
PICON, ☼ I. Minéralogie.
BACH, ☼ I. Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, ✱, ☼ A.
PICON, ☼ I.
MASCRÉ, ☼ I.
FLEURY, ☼ I.

MM. BACH, ☼ I.
BEDEL, ☼ I.
RÉGNIER, ☼ I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☼ I., *agréé*, chargé des T.P. de 1^{re} année. Chimie générale.
FLEURY, ☼ I. et RÉGNIER, ☼ I. : *agréés*,
chargés des travaux de Chimie analytique.
SOUÈGE, ☼ I. Micrographie.
LEROUX, ✱, ☼ I. Physique.
DEVAL, ✱, ☼ I. Microbiologie.
DELABY, ✱, ☼ I., PICON, ☼ I., et MASCRÉ, ☼ I. :
agréés, chargés des travaux généraux de 4^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, ☼ A.



A MON GRAND-PÈRE

A MA MÈRE

A MON PÈRE

A MA FIANCÉE

A MON FRÈRE

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR COUTIÈRE

Professeur de zoologie à la Faculté de Pharmacie,
Membre de l'Académie de Médecine.

*Qui me fait l'honneur de présider cette
thèse, en témoignage de respectueuse recon-
naissance et de profond dévouement.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GUÉRIN

Doyen de la Faculté de Pharmacie,
Professeur de botanique générale,

*En hommage de ma gratitude et de mon
profond respect,*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. RÉGNIER

Pharmacien des Hôpitaux de Paris.

*A qui je dois le sujet de cette thèse et dont
les conseils éclairés m'ont permis de mener
cette tâche à bien*

*Hommage de sincère reconnaissance et de
respectueux dévouement.*

A MONSIEUR R. DAVID

Pharmacien des Hôpitaux de Paris.

*Qui a eu la bienveillance de me guider
dans ces recherches, en remerciement de son
aide si diligente et si aimable.*

INTRODUCTION

La pharmacologie utilise de plus en plus les essais dits physiologiques. En effet si les méthodes physiques ou chimiques, presque exclusivement utilisées autrefois, donnent d'excellents résultats lorsqu'il s'agit de doser un seul corps en solution simple ou de séparer quelques composés suffisamment distincts les uns des autres, ces techniques conduisent parfois à des résultats difficiles, sinon impossibles, à interpréter correctement. Sans envisager le cas de composés mal définis ou agissant à faibles doses comme les hormones ou les vitamines, nous savons combien la complexité du solvant (sérum sanguin, liquide pathologique, etc...) ou la présence de composés voisins (alcaloïdes d'action différente bien que de composition voisine) rendent délicats le dosage rigoureux d'un principe défini. Les pharmacologistes ont donc été amenés à adjoindre aux dosages physiques ou chimiques des dosages physiologiques. L'étude des préparations de belladone, d'aconit, ou de digitale, par exemple, a largement bénéficié de cette manière de voir.

Jusqu'à ces dernières années les recherches physiologiques étaient effectuées uniquement sur des animaux appartenant d'ailleurs aux genres les plus divers. Si les mammifères étaient utilisés dans la plupart des cas, on employait également des oiseaux, des batraciens, des poissons, des vers de terre. Dans les circonstances les plus favorables les essais physiologiques traduisent directement l'action thérapeutique recherchée pour le produit étudié (élévation de la pression artérielle dans le cas de l'adrénaline, action mydriatique de l'atropine, mesure des anesthésies pour la cocaïne). Dans les autres cas on substitue à l'évaluation d'une propriété essentielle celle d'une propriété secondaire (mesure de la toxicité) et l'on admet que les variations de la seconde correspondent proportionnellement à celles de la pre-

nière. Cependant quelle que soit la technique utilisée, tous les essais physiologiques consistent essentiellement à chiffrer, le plus exactement possible, les réactions d'un groupe de cellules animales vivantes soumises à l'action d'un produit déterminé.

A partir de 1922, D. I. MACHT (107) a eu l'idée d'utiliser également, comme réactif fondamental, des cellules végétales vivantes et d'étudier l'influence de certaines substances sur le développement d'un végétal. A cette nouvelle branche de la pharmacodynamie, il a donné le nom de phytopharmacologie, réservant le terme de techniques zoopharmacologiques aux essais physiologiques tels que nous les concevons habituellement. A vrai dire un certain nombre de travaux avaient déjà montré l'extrême sensibilité des végétaux vis-à-vis de certains composés ou même de diverses hormones; mais c'est à D. I. MACHT que nous devons la mise au point d'une technique facile, permettant de mettre rapidement en évidence l'influence d'un composé quelconque sur la croissance d'un végétal. La technique proposée par cet auteur est la suivante : le réactif végétal est constitué par de jeunes racines de lupin se développant sur un milieu de culture favorable. L'action du corps à étudier se traduit, au bout de 24 heures, par un ralentissement de la croissance de ces racines dont il sera facile de chiffrer l'importance en comparant l'allongement des racines intoxiquées à l'allongement d'une série témoin.

Dans ses premières recherches, D. I. MACHT, en collaboration avec M. B. LEVINGSTON (107), avait étudié l'influence du chlorhydrate de cocaïne et de ses produits de dédoublement sur la croissance des racines de lupin. Les différences de toxicité ainsi constatées ont engagé J. RÉGNIER, puis R. DAVID et nous-mêmes, à utiliser la même méthode pour suivre les altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne sous l'influence du chauffage et du vieillissement. Nous étions en outre encouragés dans cette voie par le fait que D. I. MACHT et H. LEACH (115) avaient également montré que l'altération des solutions de chlorhydrate de cocaïne sous l'influence de la lumière polarisée pouvait être décelée, non seulement par les procédés habituels (méthodes zoopharmacologiques, psycho-pharmacologiques ou physicochimiques), mais encore par la technique phytopharmacologique.

La cocaïne ou méthylbenzoylecgonine est susceptible d'être saponifiée, en solution aqueuse, et de donner naissance à un certain nombre de composés : alcool méthylique, benzoylecgonine, acide benzoïque, méthylecgonine, ecgonine et accessoirement benzoate de méthyle. Tous ces composés étant dépourvus de propriétés anesthésiques, il importait de déterminer les proportions de chlorhydrate de cocaïne restant inaltérées dans des solutions stérilisées à des températures plus ou moins élevées ou conservées pendant un certain temps. De nombreux auteurs, utilisant des techniques fort diverses se sont efforcés de résoudre ce problème. Tandis que HERISSEY (70), ARNAUD, DUFFOUR et RIBAUT, MACHT, LESURE (89), NYMANN et BJORKSTEN (148), MOSSLER (141), J. RÉGNIER (161), A. LIOT (94), L. ROY (178), DIETZEL et STEEGER (44), SVEND-AAGE-SCHOU et ERIK HELM (200) employaient des mé-

thodes chimiques ou physiologiques, MERCK, O. GROS (63), A. RIPPEL (175), PITTENGER, J. RÉGNIER et ses collaborateurs avaient recours à des techniques physiologiques. Si les premiers résultats obtenus ont été parfois discordants par suite de l'imperfection des méthodes employées, l'utilisation de techniques plus précises a conduit récemment à des conclusions très voisines malgré la diversité des procédés employés.

Les altérations des solutions aqueuses de chlorhydrate de cocaïne sous l'influence du chauffage et du vieillissement sont maintenant bien connues.

La stérilisation par la chaleur détruit une faible fraction de l'alcaloïde qui, pour une opération normale (solutions non tamponnées, verre ordinaire, température comprise entre 100 et 120°) ne dépasse pas 10 %. Les chiffres indiqués, à ce sujet, par différents auteurs sont en effet les suivants : 5 % (DUFFOUR), 0,60 % (MERCK), de 0,80 à 1,60 % (LESURE), 2,30 % (MOSSLER), 1 % (L. ROY), 5 % (DIETZEL et STEEGER), de 2 à 10 % (J. RÉGNIER).

L'activité des solutions de chlorhydrate de cocaïne diminue également pendant leur conservation. Cette diminution, qui s'observe même pour des solutions non chauffées et maintenues à la glacière, a été, en particulier, signalée par O. GROS, EBERT, A. RIPPEL, J. RÉGNIER, A. LIOT et R. DAVID. D'après ces derniers auteurs, une solution de chlorhydrate de cocaïne à 1 % stérilisée à 100° et placée à l'obscurité et à la température ordinaire, avait perdu, après 20 mois de conservation, environ 20 % de son activité initiale.

Enfin la stabilité des solutions de chlorhydrate de cocaïne dépend également de leur réaction initiale qui, dans le cas de milieux tamponnés, peut jouer un rôle extrêmement important. Déjà les essais de DUFFOUR et RIBAUT, de LESURE, de MOSSLER et de WATSON-WILLIAMS avaient montré l'influence défavorable exercée par l'alcalinité du verre des récipients utilisés. Les recherches de A. RIPPEL, puis celles de J. RÉGNIER et R. DAVID et de R. DIETZEL et O. STEEGER permirent de préciser ces premières données et de montrer que les solutions de chlorhydrate de cocaïne ne résistent relativement bien à la stérilisation que si leur pH initial est compris entre 3 et 4.

Il était donc intéressant d'appliquer la technique de D. I. MACHT à l'étude des altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne en envisageant successivement l'influence de la chaleur, du vieillissement et de la réaction initiale. La comparaison des résultats obtenus avec ceux que nous venons d'exposer nous renseignera d'abord sur la valeur de la méthode de D. I. MACHT, appliquée au cas qui nous occupe, et nous permettra, peut-être, de compléter, ou de préciser, les données actuellement admises au sujet de la stabilité des solutions de chlorhydrate de cocaïne.

Le travail que nous présentons est divisé en deux parties : les deux premiers chapitres nous permettent de mettre au point la technique utilisée, les deux derniers réunissent nos essais personnels.

Dans le premier chapitre, nous passons en revue les princi-

paux travaux ayant mis en évidence l'influence exercée par de faibles quantités de substances diverses sur l'évolution des végétaux et nous indiquons, en même temps, les méthodes les plus intéressantes employées par les différents auteurs. La comparaison des résultats ainsi rapportés montre que la cellule végétale constitue souvent un réactif particulièrement sensible et que, parmi toutes les techniques utilisables, celle de D. I. MACHT se recommande par sa rapidité et par sa simplicité.

Le deuxième chapitre est réservé entièrement à la mise au point de la technique utilisée dans nos essais. Nous pensons en effet qu'un mode opératoire, rigoureusement déterminé, est indispensable pour obtenir des résultats facilement comparables. Nous avons ainsi été amenés à préciser différents points de la technique originale de D. I. MACHT et surtout à mettre en évidence l'influence exercée par la réaction des milieux de culture sur la croissance des jeunes racines de lupin. De plus, tandis que cet auteur réduit à 24 heures la durée de ses essais, nous avons jugé utile de comparer non seulement les accroissements pendant la première journée de séjour à l'étuve, mais encore les allongements survenus pendant une seconde journée. Enfin nous avons joint à ces déterminations linéaires, l'étude de la structure des plantes intoxiquées, structure que nous avons comparée, dans tous les cas, à celle des plantes témoins.

Dans le troisième chapitre nous montrons que la toxicité des solutions de chlorhydrate de cocaïne, par rapport aux jeunes racines de lupin, s'accroît progressivement avec l'augmentation du temps de chauffage et avec le vieillissement. Les résultats ainsi obtenus sont comparables à ceux qui ont été trouvés par différents auteurs employant des techniques fort différentes de la nôtre : mesure des anesthésies (J. RÉGNIER) ou déterminations physico-chimiques (DIETZEL et STEEGER) et la technique que nous avons employée permet de suivre les altérations progressives des solutions de chlorhydrate de cocaïne, lorsque le temps de chauffage à l'autoclave croît de 15 minutes à 48 heures ou quand la durée de conservation passe de 6 mois à 10 ans.

Dans le quatrième chapitre nous étudions l'influence de la réaction initiale sur la stabilité des solutions de chlorhydrate de cocaïne soumises à la stérilisation à l'autoclave. Là encore nos conclusions rejoignent celles des auteurs qui se sont occupés de la même question. Enfin la détermination de l'activité exercée, sur la croissance des racines de lupin, par les produits susceptibles de prendre naissance au cours de la saponification de la cocaïne nous montre que l'augmentation de la toxicité des solutions de chlorhydrate de cocaïne provoquée par la chaleur et le vieillissement est due à la mise en liberté d'acide benzoïque. La technique phytopharmacologique de D. I. MACHT permet donc de séparer les deux processus de saponification de la molécule cocaïne et de n'étudier que la saponification benzoïque.

Ce travail a été effectué tant au laboratoire de M. R. DAVID à l'hôpital Bichat qu'au laboratoire de M. J. RÉGNIER à l'hôpital Ambroise-Paré.

Nous sommes particulièrement heureux de pouvoir remercier

respectueusement M. le professeur COUTIÈRE qui a bien voulu nous inscrire dans son laboratoire de la Faculté de Pharmacie.

M. le professeur agrégé J. RÉGNIER a bien voulu nous donner le sujet de cette thèse qui vient prendre place dans l'ensemble des travaux qu'il poursuit, avec ses collaborateurs, sur l'anesthésie locale. Pendant tout le temps qu'a duré ce travail, il n'a cessé de nous prodiguer ses conseils et de nous soutenir de ses encouragements. Qu'il nous soit permis de l'assurer de notre respectueux dévouement.

M. R. DAVID, pharmacien des hôpitaux, a bien voulu nous admettre parmi ses internes et pendant tout le temps de notre internat nous a fait profiter et de toute façon, de sa grande compétence. L'intérêt qu'il nous a porté pendant nos études et au cours de ce travail nous commande la plus respectueuse reconnaissance.

CHAPITRE PREMIER

LA PHYTOPHARMACOLOGIE PRINCIPAUX RÉSULTATS OBTENUS

Sous le terme de phytopharmacologie, D. I. MACHT (107) comprend l'étude des changements produits dans l'évolution des végétaux par l'addition, au milieu de culture, de substances agissant à faibles doses. Prise dans ce sens, la phytopharmacologie élimine la plupart des essais purement agricoles (influence des constituants principaux des engrais ou de la composition des sols sur le développement des végétaux) et ne retient que l'étude des actions toxiques ou stimulantes exercées sur la plante par des substances agissant à de très faibles concentrations. Si des recherches de cet ordre n'ont été systématiquement entreprises que depuis une quinzaine d'années, ce qui permettait à D. I. MACHT de dire, en 1922, que le champ de la phytopharmacologie était vierge, il n'en reste pas moins vrai que, sans remonter aux Égyptiens, qui observaient déjà l'action de l'urine de femme sur la germination des graines (137) nous trouvons, dans la bibliographie, un grand nombre de travaux se rapportant à cette question. Nous ne mentionnerons ici que les plus importants, en insistant plus spécialement sur le rôle joué par les alcaloïdes et, particulièrement par la cocaïne.

Pour donner à notre exposé une certaine cohérence, nous n'avons pas suivi un ordre chronologique rigoureux et nous avons groupé dans un même paragraphe les travaux parus à peu d'années d'intervalle et se rapportant au même sujet. Certain mémoires particulièrement importants ont fait l'objet d'un développement spécial. Cet historique très succinct de la phytopharmacologie s'est trouvé de ce fait divisé en vastes tranches inégales, mais le plus possible naturelles: une telle division nous a paru avoir le mérite de rendre cet exposé plus clair et plus facile à lire.

TRAVAUX DE P. O. RÉVEIL

Dans un travail considérable publié en 1865, P. O. RÉVEIL (173) étudie l'action d'un très grand nombre de composés minéraux ou organiques sur les végétaux. Cet exposé est précédé d'une abondante bibliographie qui nous a fourni un certain nombre d'indications.

D'après RÉVEIL, les premières expériences relatives à l'absorption par les plantes ont été faites par HALLES et DUHAMEL, en 1790, et par ACHARD (1) qui faisait paraître l'année suivante un mémoire sur la nutrition des végétaux et sur les altérations qu'éprouvent les différentes substances par la végétation.

A leur suite, en 1801, LEFÉBURE (88) étudiait l'action de l'oxyde d'antimoine sur la germination, THÉODORE DE SAUSSURE (180), en 1804, publiait de nouvelles expériences sur l'absorption chez les plantes, VAUQUELIN (210) trouvait du fer à l'état de gallate dans le liège et MEISNER (127), en 1817, décelait du cuivre dans les végétaux avant que PHILIPPS (151) n'ait démontré, en 1821, l'absorption de ce métal par les plantes.

En 1825, les premières recherches sur la toxicité vis-à-vis des plantes de l'anhydride arsénieux, du sublimé, des sels d'étain, de plomb et de cuivre étaient présentées par MARCET (124). La même année MEISNER, après avoir montré que les sels de plomb, les sels d'étain et l'acide sulfurique sont toxiques pour les plantes et que la potasse, le sulfate de magnésium et le chlorure de sodium sont inactifs, étudiait, le premier, l'action de diverses substances organiques. Il observait ainsi que l'extrait d'opium, l'extrait de noix vomique, l'extrait de coque du Levant, l'acide cyanhydrique et l'eau de laurier-cerise tuaient les haricots; tandis que les extraits de morelle, de ciguë et de digitale paraissaient agir plus lentement. De ces essais MEISNER tirait les conclusions suivantes : « les poisons métalliques agissent sur les « végétaux à peu près de même que sur les animaux; ils paraissent être absorbés et entraînés dans les différentes parties de « la plante et en altèrent et détruisent les tissus par leur pouvoir « corrosif. Les poisons végétaux, en particulier ceux qui sont « démontrés ne détruire les animaux que par leur action sur « le système nerveux, causent aussi la mort des plantes; or « comme l'on ne peut concevoir que des poisons qui n'altèrent « d'aucune manière les tissus organiques des animaux, puissent « altérer ceux des végétaux jusqu'au point de les tuer au bout « d'un petit nombre d'heures, il me paraît probable, très pro-

« bable, qu'il existe chez les végétaux, un système d'organe qui « est affecté par certains poisons végétaux à peu près de la même « manière que le système nerveux. »

Inversement JULIO (76) notait l'influence favorable exercée par certains corps sur les végétaux. Les fleurs d'un *Mesembrianthemum barbatum* s'ouvraient plus tôt le matin et se refermaient plus tard le soir lorsque leurs racines plongeaient dans de l'eau alcoolisée ou dans une solution aqueuse d'opium additionnée de suc gastrique de corneille.

PRINCEPS (154) recherchait l'action des principes toxiques d'origine végétale sur les plantes qui les avaient produits (extrait de datura ou de jusquiame sur des plants de datura ou de jusquiame). Il notait également que l'opium et l'acide cyanhydrique modifiaient les mouvements des folioles et des feuilles de *Mimosa pudica* et empêchaient la contraction des étamines de *Berberis vulgaris*. L'action de l'acide cyanhydrique sur les végétaux avait été également mise en évidence par GIANELLI (58) et surtout par H. GOEPPERT (61). Ce dernier auteur étudiait également l'action de diverses essences et de composés variés : camphre, cyanure, éther, alcool, sulfure de carbone, etc...

VOGEL, en 1830 (211), s'intéressait plus particulièrement à l'influence sur la germination des graines, d'un certain nombre de substances. Parmi celles-ci, les unes, kermès, carbonate de baryum, sulfate de cuivre, bichlorure de mercure, etc... inhibaient la germination du froment et de l'orge; les autres, ou bien ne permettaient qu'une germination ralentie, ou bien étaient sans action.

Des travaux de A. F. LINK (91), en 1831, nous retiendrons simplement cette hypothèse que l'absorption des substances hétérogènes, dans les tissus des végétaux, ne peut avoir lieu qu'à la faveur d'une désorganisation de quelques-unes de leurs parties. Cette lésion peut être le fait, soit d'un traumatisme ou d'un état morbide, soit l'effet de la substance toxique elle-même qui pénètre alors par capillarité dans les tissus. De même, d'après RAINEY (159), le sublimé ne serait absorbé que si la plante est désorganisée.

BRACONNOT (18), en 1839, montrait que les acétates de calcium et de magnésium exerçaient une action nuisible sur les végétaux à la concentration de 1/1.000. Un peu plus tard LIEBIG (90) indiquait que les oxydes et les acides attaquaient les tissus pour former de nouveaux composés. Il admettait en outre l'absorption des liquides colorés par les plantes.

L'utilisation de l'arsenic en agriculture donnait lieu à un certain nombre de travaux. D'après LOUYER (98), en 1841, une proportion suffisante d'anhydride arsénieux, dans un terrain de culture, empêche la germination des graines; des concentrations plus faibles sont sans action et les plantes développées dans ces conditions ne contiennent pas d'arsenic. AD. CHATIN (23), en 1845, arrosait des plantes avec des solutions saturées d'anhydride arsénieux et constatait de graves symptômes d'empoisonnement. Il trouvait ensuite de l'arsenic dans tous les organes et essayait comme antidote de ce métalloïde, le chlorure de calcium. Il est

à noter que cette absorption de l'arsenic retrouvée par FIBLOL (53), puis par STEIN (193), était contestée par TARGIONI TOZETTI (203).

P. O. REVEIL terminait sa bibliographie en rappelant les recherches de BOUCHARDAT (16) sur l'action de différents composés parmi lesquels les sels de morphine et les travaux de CAUVET (21) dont il reproduisait les conclusions. Pour ce dernier auteur « des racines physiologiquement saines n'absorbent pas indifféremment toutes les substances en dissolution dans l'eau. Elles n'absorbent des substances colorées, soit vénéneuses, soit inertes qu'après une destruction plus ou moins complète de leurs spongioles. Elles meurent alors, en entraînant la mort des plantes et celles-ci ne peuvent plus en développer de nouvelles. Les racines physiologiquement saines ne rejettent aucune des substances vénéneuses ou autres absorbées par une portion quelconque de la plante. Quand une plante survit à l'action momentanée d'un poison, celui-ci se localise dans les feuilles qui meurent dans l'ordre chronologique de leur évolution. Une faible partie du poison est rejetée par les feuilles dans l'eau transpirée. L'acide arsénieux n'est pas absorbé par les plantes venues dans un sol empoisonné, si ce poison n'est pas en grande quantité autour des racines. Dans ce cas il arrête la germination et tue la jeune plante. Si celle-ci se développe on ne trouve pas dans ses fruits une quantité de poison appréciable par l'analyse chimique et les animaux nourris avec les fanes de ces plantes n'en paraissent pas incommodés ».

REVEIL a effectué lui-même de vastes recherches sur l'action toxique vis-à-vis des végétaux d'un très grand nombre de composés.

Il utilisait concurremment cinq techniques : semis, bouturage, plantation dans du sable lavé, plantation dans le sol et immersion dans des solution actives.

MÉTHODE PAR SEMIS :

REVEIL semait dans du sable calciné et lavé des graines d'orge, de cresson, de haricot et de chenuevis. Il plongeait au préalable ses graines dans l'eau pour s'assurer qu'elles avaient conservé leur pouvoir germinatif et rejetait celles qui surnageaient. Le sable était arrosé avec des solutions à étudier dont l'influence s'exerçait dans ce cas principalement sur la germination.

MÉTHODE PAR BOUTURAGE :

Des boutures étaient repiquées dans le sol et arrosées avec les solutions actives; elles se flétrissaient au bout d'un certain temps que REVEIL notait.

MÉTHODE PAR PLANTATION DANS LE SABLE :

Des graines déjà germées étaient plantées dans du sable lavé qui était imprégné des solutions à expérimenter.

MÉTHODE PAR PLANTATION DANS LE SOL :

Des jeunes plants étaient repiqués dans un sol arrosé à l'aide de ces mêmes solutions.

MÉTHODE PAR IMMERSION :

Enfin quelquefois des graines étaient simplement immergées dans les solutions actives, elles y germaient et s'y développaient.

Nous devons ajouter que REVEIL ne mesurait pas ses sujets et ne pesait pas ses récoltes. Il se contentait de décrire les différents aspects par lesquels passaient ses plantes suivant qu'elles résistaient et continuaient à croître ou qu'elles se flétrissaient et finissaient par mourir.

Le travail de REVEIL est divisé en deux chapitres : sels minéraux et produits organiques. L'auteur passe d'abord en revue l'action de très nombreux composés minéraux : halogènes, acides minéraux dilués, composés de l'arsenic, et sels de potassium. Il insiste au sujet de ces derniers sur la grande toxicité des chlorates et des iodates. Il trouve les sulfures alcalins peu actifs et signale déjà que les sels d'ammonium, stimulants à faible dose, agissent comme toxiques à des concentrations plus élevées. Parmi les métaux lourds, l'auteur étudie l'action des sels de fer, de zinc, de cuivre, de plomb, de mercure et de l'émétique. Enfin, ses travaux portent sur quelques produits insolubles comme la fleur de soufre, l'oxyde de zinc, l'oxyde d'antimoine, la céruse, le sous-nitrate de bismuth, le calomel, le kermès et le sulfate de quinine.

P. O. RÉVEIL sépare les corps qu'il appelle « poisons organiques » en acides organiques, bases organiques et corps neutres. Il étudie ainsi l'action des principaux acides organiques comme les acides citrique, acétique, oxalique, tartrique et cyanhydrique. Ses travaux sur l'acide benzoïque nous intéressent plus particulièrement : « une menthe poivrée, arrosée avec une solution d'acide benzoïque à 1 pour 1000 voit ses feuilles devenir flasques, dès le lendemain molles, elles perdirent leur turgescence et la plante est morte six jours après l'arrosage.

« L'action puissante de l'acide benzoïque sur les plantes ne nous paraît pas venir de sa nature acide, ses relations avec l'essence d'amandes amères qui, nous le verrons, est un poison violent pour les plantes pourraient faire supposer que la transformation de l'acide en essence s'opère dans la plante... Les expériences que nous avons faites pour rechercher à opérer cette transformation n'ont donné aucun résultat satisfaisant ».

Ce que REVEIL appelait les bases organiques comprenait des alcaloïdes variés : atropine, morphine, narcotine, codéine, nicotine, quinine, cinchonine, strychnine et brucine, il n'était pas question de la cocaïne qui, il est vrai, n'avait été extraite des feuilles de coca que peu de temps auparavant (1855). Il réunissait enfin sous le terme de corps neutres, un groupe de produits très différents, comme les essences, le camphre, la créosote,

le glucose, le chloroforme, l'éther, l'éther acétique et le chlorure d'éthyle.

Enfin l'auteur étudiait également l'absorption de quelques corps par les parties aériennes des plantes.

Des nombreuses conclusions que RÉVEIL tirait de son important travail nous retiendrons simplement les indications suivantes : la toxicité des composés minéraux s'ordonne selon une série décroissante de la façon suivante en ce qui concerne les cathions : arsenic, mercure, antimoine, cuivre, plomb, étain, bismuth, et quant aux anions selon la série suivante : chlorate, iodate, iodure. Les poisons minéraux corrosifs agissent sur les végétaux de deux manières, tantôt ils corrodent les tissus, dessèchent et atrophient les spongioles (arsénicaux), ou les gonflent et les ramollissent (chlorates); mais par une action mystérieuse et secondaire, ils peuvent être absorbés et tuer les plantes sans qu'il y ait de lésions. Parmi les acides organiques, l'acide benzoïque est celui qui tue le plus rapidement les plantes et à plus faible dose, cette action puissante paraît tenir à autre chose qu'à sa nature acide. A part de rares exceptions il n'existe aucun rapport entre l'action des poisons sur les animaux et l'action qu'ils exercent sur les végétaux.

TRAVAUX ANTÉRIEURS A 1914

Le nombre de travaux de phytopharmacologie parus entre le mémoire de P. O. REVEIL et la dernière guerre est considérable. Nous avons rassemblé ici les plus importants en les séparant autant que possible en quatre groupes principaux : recherches relatives aux composés volatils et en particulier aux anesthésiques généraux, premiers travaux sur les alcaloïdes, essais sur la toxicité des éléments minéraux, travaux plus récents de W. SIGMUND et de différents auteurs sur l'influence exercée par les alcaloïdes sur la biologie de la plante.

Anesthésiques généraux et composés volatils

CLAUDE BERNARD avait, en 1872, publié ses recherches sur l'inhibition de l'assimilation chlorophyllienne par les anesthésiques généraux, éther et chloroforme. Cette action des anesthésiques généraux lui avait permis de séparer la fonction chlorophyllienne

de la respiration. JOLYET, en 1873 (75), à la suite de BOUSSAIN-GAULT qui avait constaté les mêmes phénomènes avec les vapeurs de mercure, montrait que les vapeurs de mercure-éthyle inhibaient la fonction chlorophyllienne sans toucher à la respiration.

HENRI JUMELLE, en 1830, (77), découvrait que les anesthésiques employés, à des doses qui suspendent l'assimilation chlorophyllienne, augmentent la transpiration des plantes exposées à la lumière et diminuent celle de plantes placées à l'obscurité.

G. CUGINI (43), en 1881, reprenait les expériences de MACHIATI au sujet de l'action de l'éther et du chloroforme sur les étamines irritables de *Ruta brateosa* et de *Smyrniurn rotundifolium*. Il utilisait les espèces suivantes : *Mimosa pudica*, *Mahonia* et *Berberis*. Il constatait que les phénomènes d'inhibition de l'irritabilité étaient dus, non pas à l'abaissement de température produit par l'évaporation des anesthésiques, comme le croyait cet auteur, mais à l'action propre de l'éther et du chloroforme.

Avant de passer à d'autres essais nous citerons les travaux d'E. MER et de Max CORNU (128) : dès 1878, ces auteurs s'intéressaient à l'action des colorants sur les végétaux. Ils cultivaient des bulbes de jacinthes, de *crocus*, de *narcissus* et d'*allium* dont les racines trempaient dans des solutions de colorants variés : carmin, campêche, bleu d'aniline, fuschine; sauf dans le cas de la fuschine, les racines ne se coloraient pas intérieurement tant qu'elles étaient en vie.

Premiers travaux sur les alcaloïdes

A cette même époque paraissait une longue suite de travaux qui intéressaient plus particulièrement les alcaloïdes. Leurs auteurs peuvent être plutôt considérés comme les précurseurs de W. SIGMUND et D. I. MACHT ainsi que nous aurons l'occasion de le voir; c'est à ce titre que nous les avons réunis dans les pages suivantes en les séparant ainsi de ces derniers auteurs.

Les propriétés anesthésiques de la cocaïne commençaient à être bien connues quand AUGUSTE CHARPENTIER (22), en 1885, rappelant les expériences de CLAUDE BERNARD sur le chloroforme et l'éther, se demandait si la cocaïne, anesthésique local, jouissait, sur les végétaux, des mêmes propriétés que les anesthésiques généraux. « J'ai pu, écrivait-il, anesthésier la graine du cresson « alénois en la plaçant dans une solution de chlorhydrate de cocaïne à 5 %, la germination n'a pas eu lieu dans cette solution, « tandis qu'elle se produit, très facilement, dans la même quantité d'eau et les graines de la solution de cocaïne une fois « lavées peuvent germer. »

M. DUBOIS (46), la même année, n'admettait pas les conclusions de CHARPENTIER, il faisait germer les graines de cresson alénois dans des solutions de chlorhydrate de morphine, de strychnine,

de quinine et de cocaïne. La germination était avancée de trois jours dans la solution de strychnine, un peu moins dans les solutions de cocaïne et de morphine et beaucoup moins dans la solution de quinine. Toutefois, tandis que CHARPENTIER utilisait une solution de chlorhydrate de cocaïne à 5 %, les solutions d'alcaloïdes de DUBOIS n'étaient qu'à 1 % et cette différence de titre explique, sans doute, la divergence des résultats trouvés.

Sur la cocaïne également KRUTICKJ (85) publiait, en 1887, un travail très intéressant. Il introduisait à l'aide d'un scalpel des solutions à 1 et à 2 % (plus fortes elles agiraient trop violemment) de chlorhydrate de cocaïne dans l'écorce des pétioles et des tiges d'un pied de *Mimosa pudica*. L'action de ce sel se manifestait d'abord, au bout de quelques minutes, dans la feuille opérée et s'étendait ensuite à toutes les feuilles placées au-dessus d'elle. Les feuilles et les folioles intoxiqués prenaient une demi position de veille, puis commençaient à se redresser au bout de trois quarts d'heure, pendant que les feuilles inférieures présentaient une inclinaison à peine sensible. L'action anesthésique de la cocaïne s'exerçait seulement sur la feuille opérée, qui, après deux minutes, ne réagissait plus aux excitations extérieures, tandis que la sensibilité des feuilles supérieures n'était pas notablement diminuée. Dans un cas toutes les feuilles de la plante ont été opérées en même temps; elles exécutèrent pendant près d'une heure des oscillations irrégulières, s'affaissèrent définitivement et la plante mourut.

Une mention particulière peut être faite aux travaux de CHARLES CORNEVIN (33), en 1891, qui se plaçait à un point de vue spécial. Il se demandait, si les toxiques élaborés par les plantes peuvent nuire à la germination et à la végétation des plantes qui les produisent. Il distinguait deux cas : soit que les toxiques existent au cours de toute la végétation, dans la graine, dans la plantule et dans la plante sans que la plante cesse de renfermer des composés toxiques; soit que les toxiques n'existent ni dans la graine, ni dans la plantule, mais n'apparaissent que dans la plante adulte. Il utilisait deux procédés de recherches : les graines étaient, soit immergées pendant un certain temps dans la solution active puis plantées dans le sol, soit semées dans une terre imprégnée des solutions à étudier. À la suite d'expériences avec les saponines et la cytisine sur des *Agrostema Githago* et des *Cytisus laburnum*, l'auteur concluait que la germination n'est nullement entravée par l'action d'un poison retiré de la graine. Au contraire, les toxiques élaborés par la plante adulte ont une action très nette sur la germination des plantes qui les produisent. Des graines de tabac préalablement immergées pendant 38 heures dans une solution de nicotine à 1/150^e, germaient avec 48 heures de retard. Les mêmes graines, semées dans une terre qui avait été arrosée avec cette même solution, ont germé avec 10 jours de retard et beaucoup sont mortes ensuite. Inversement, des graines de pavots, après immersion dans une solution aqueuse d'extract d'opium, ou semées dans une terre imprégnée de cette solution, germaient 24 heures

avant les graines témoins. Cette stimulation serait, d'après les travaux de l'auteur, due à la narcotine, à la codéine et à la narcéine; la morphine et la thébaïne seraient inactives; la papavérine aurait une action toxique.

Un peu plus tard UGOLIN Mosso (140), en 1894, recherchait quelle concentration d'alcaloïde pouvait stimuler, ralentir ou inhiber le développement de la graine et de la plante.

Il utilisait des graines de haricots d'Espagne, de la dernière récolte, et les faisait germer sur du coton hydrophile humecté à l'aide de la solution d'alcaloïde. Les graines étaient placées, le hile en haut, dans une série de verres renfermant chacun cinq graines et disposés à l'abri des rayons directs du soleil. L'épreuve durait dix-huit jours, la température oscillait entre 12° et 15° avec un maximum de 18° et un minimum de 10°. Chaque série d'expériences comportait un témoin dans l'eau distillée. Mosso employait des solutions de chlorhydrate de morphine, de nicotine, de sulfate de strychnine, de chlorhydrate de cocaïne et de salicylate de caféine à 2, 1, 0,5, 0,10, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005 et 0,00001 %; il versait dans chaque verre 30 cm³ de ces solutions, c'est-à-dire 0 gr. 60, 0 gr. 30, 0 gr. 15 etc... de sel d'alcaloïde. Pour lutter contre l'évaporation, il ajoutait de temps en temps, dans chacun des verres, une même quantité d'eau distillée.

Cette technique permettait à l'auteur de déterminer pour chaque alcaloïde les concentrations qui empêchent la germination des graines et elle lui montrait, en même temps, qu'à des dilutions convenables, tous les alcaloïdes étudiés, sauf la caféine, favorisent l'accroissement de la tige. Cette action stimulante est particulièrement nette pour la cocaïne et la nicotine avec les dilutions à 0,01 %, pour la strychnine avec les dilutions à 0,005 %, pour la morphine avec les solutions à 0,001 % et pour l'atropine avec une solution à 0,0005 %. La zone des concentrations favorables est particulièrement étendue pour le chlorhydrate de cocaïne, puisque des concentrations prises entre 0,01 et 0,0001 % donnent un accroissement de la tige deux fois plus marqué que celui des témoins. De plus, le chlorhydrate de cocaïne se différencie des autres alcaloïdes par le fait que sa toxicité diminue rapidement avec la concentration. Tandis que les solutions à 2, à 1 et à 0,50 % empêchent la germination, la solution à 0,10 % conduit à des résultats très voisins de ceux des témoins.

Pour terminer, Mosso faisait remarquer qu'il semble exister un rapport entre l'action de ces alcaloïdes sur le règne végétal et leur action sur le règne animal. « On peut administrer à l'homme 0 gr. 20 de chlorhydrate de cocaïne, 0,005 de strychnine et 0 gr. 001 d'atropine. Les solutions de cocaïne à 2 % et à 1 % qui arrêtent et empêchent le développement du végétal, sont celles qui, injectées sous la peau, diminuent ou abolissent la perception de la douleur ».

MARCASSI (125) et plus tard SCHWARTZ étudiaient l'action des alcaloïdes en fonction de la lumière. MARCASSI, en 1895, trempait des feuilles de *Lemna minor* dans une solution de quinine à 0,25 %. Ces feuilles jaunissaient si on les exposait à la lumière, alors qu'elles restaient vertes à l'obscurité. La strychnine et la

morphine agissaient de la même façon. SCHWARTZ (186) étudiait, deux ans plus tard, l'action de divers alcaloïdes comme la quinine, la strychnine, la morphine, la cocaïne, la brucine, la conine, l'atropine, la caféine et la nicotine sur des algues, des champignons et des plantes aquatiques. La chlorophylle des algues était détruite à la lumière sous l'action des alcaloïdes. A l'obscurité elle ne subissait aucun dommage. Les champignons inférieurs ne pouvaient pas croître dans des solutions à 0,50 % de caféine ou de quinine. La nicotine, la vératrine, la strychnine et l'aconitine ne nuisaient à la croissance que si elles étaient en grande quantité. Dans les solutions de morphine, de cocaïne, de brucine et d'atropine les champignons poussaient normalement. Ils se développaient mieux dans des solutions à 0,50 % que dans les solutions à 0,05 % et cette dernière concentration leur était plus favorable que 0,005 %. Les plantes aquatiques, qui avaient été cultivées dans des solutions d'alcaloïdes présentaient des anomalies qui n'avaient pas été aperçues sur les plantes témoins. Les racines étaient courtes et touffues alors qu'elles étaient longues, sur les témoins, avec peu de racines adventives. Les tiges et les feuilles étaient retardées.

L. LUTZ (101), en 1899, étudiant le métabolisme de l'azote chez les végétaux, avait été amené à utiliser les alcaloïdes comme source d'azote (atropine, quinine, morphine, cocaïne, pipéridine). Il opérait dans des conditions d'aseptie rigoureuse, pesait les récoltes et dosait l'azote accumulé dans les plantes. Les alcaloïdes étaient employés à la concentration de 0,50 pour 50 cm³ de sol. Le chlorhydrate de cocaïne, dans ces conditions, amenait la mort au bout de quelques jours du *Cucurbita maxima* et de l'*Hélianthus annuus* et le *Zea mais* perdait finalement 13 % d'azote.

Plus tard, M. MORKOWINE (138), en 1901, montra que les alcaloïdes n'ont pas vis-à-vis de la cellule végétale des caractères de toxicité aussi considérables que vis-à-vis de la cellule animale. Leur toxicité par rapport aux végétaux s'ordonne selon une série analogue à celle de SCHWARTZ.

Action des éléments minéraux et de quelques composés bien définis

Pendant que paraissaient les travaux que nous venons de résumer, d'autres auteurs continuaient à s'intéresser à l'influence des sels minéraux ou de différents composés de constitution simple, sur les végétaux.

En 1882, PHILIPPS FRANCIS (152) analysait des cendres de plantes qui s'étaient développées normalement. Il y trouvait de petites quantités de zinc, de cuivre, d'arsenic et de plomb que leurs

racines avaient absorbées. Il étudiait alors l'action des sels de ces métaux sur les végétaux et signalait que le plomb et l'étain n'amenaient aucun désordre dans la croissance, alors que le cuivre et l'arsenic exerçaient une action toxique s'ils étaient en quantité importante.

GAUNERSDÖRFER (57), en 1887, entreprenait, le premier, l'étude de l'influence toxique des sels de lithium sur des plantes variées. LOEW (97), en 1892, publiait ses recherches sur la toxicité du fluorure de sodium qui tuait en vingt-quatre heures le *Vallisneria* et l'*Elodea* dès la concentration de 0 gr. 20 %.

J. MOREL (136), la même année, étudiait l'action de l'acide borique et du borate de sodium sur le blé et le haricot : « l'acide « borique en solution mis en contact avec les graines des végétaux ralentit et empêche complètement les phénomènes de « germination, si le contact est suffisamment prolongé, ou si la « solution est assez concentrée. L'action du borate de sodium est « tout à fait comparable à celle de l'acide borique ». En 1893, THOMPSON (206) concluait à la toxicité du sulfate ferrique pour les végétaux et WYPEL (213) établissait un ordre de toxicité entre les différents chlorures, bromures et fluorures vis-à-vis des algues. Les fluorures sont plus toxiques que les bromures et que les chlorures. Les sels d'ammonium sont de beaucoup les plus toxiques de ces composés halogénés.

Plus tard, en 1897, S. TAKABAYASHI (202), de l'école de Tokio, insistera sur la toxicité des sels d'ammonium pour les végétaux.

EMMANUEL THÉORODESCO (204), en 1898, s'attachait à découvrir l'influence de l'acide carbonique sur la forme et la structure des plantes, en cultivant des *Lupinus albus*, *Phaseolus multiflorus*, *Pisum sativum*, *Faba vulgaris*, dans une atmosphère chargée de gaz carbonique; sous l'action de ce corps, il observait un raccourcissement de l'axe hypocotyle et des premiers entrenœuds, largement compensé par l'allongement des entrenœuds suivants, de sorte que les tiges des plantes traitées étaient plus longues que celles des témoins. De plus, dans le premier cas, les entrenœuds présentaient une section plus large et renfermaient un nombre de faisceaux libéro-ligneux plus important que dans le second. Enfin, les feuilles cultivées en présence de CO² étaient plus épaisses, leur tissu palissadique était formé de cellules plus allongées et les espaces aérifères y étaient plus développés.

En 1899, FASSENBENDER et GREVILLIUS (51) publiaient des recherches sur l'action de l'acide acétique en solution ou à l'état de vapeur sur des graines et des plantules de haricots, de pois et d'avoine. Ces plantes périssaient dès que l'air contenait de 0,3 à 0,4 % de vapeurs acides. Les solutions d'acide acétique ralentissaient la germination des haricots et des pois à la dose de 0,001 à 0,01 %; la croissance du lin était gênée dès 0,05 %, celle du pois n'était ralentie qu'à partir de 0,20 %; dans les solutions à 0,50 % aucune semence ne germait plus.

CLARK (26), en 1901, faisait paraître un travail dans lequel il recherchait si l'addition de différents sels, principalement de chlorure de sodium, augmentait la toxicité des solutions de su-

blimé, comme on le prétendait à cette époque. Après des expériences sur les champignons saprophytes, il concluait que l'addition de chlorure de sodium n'agit pas sur la toxicité propre du sublimé.

MIANI (133), la même année, laissait des monnaies de cuivre au contact avec de l'eau distillée : cette eau ne nuisait pas au développement des grains de pollen et des spores d'*Ustilago*. Les grains de pollen se développaient presque mieux dans ces liquides que dans l'eau pure. LABAUD (87) attirait l'attention sur la toxicité du zinc qui serait nuisible pour les végétaux à partir de 1 à 5 mmg. par litre. Enfin, L. SUKATSCHEFF (198), en 1902, constatait que des graines de *Lupinus mutabilis* ou de *Pisum sativum*, malgré une macération de 1 à 5 jours dans l'alcool à 90° ou à 100°, conservaient leur pouvoir germinatif.

À cette même époque, paraissait à Tokio toute une série de travaux sur la toxicité de divers composés vis-à-vis des végétaux supérieurs.

LOEW et TSUKAMOTO (96) étudiaient l'action du cyanogène sur les bactéries, les algues et les phanérogames; S. SUSUKI (199) insistait sur la toxicité du ferro-cyanure de potassium; TAKABAYASHI (202), comme nous l'avons déjà indiqué plus haut, mettait en évidence la toxicité des sels ammoniacaux.

S. SAWA (181), en 1902, montrait que la caféine et l'antipyrine à la concentration de 1 pour 1.000, nuisent au développement des plants d'oignons et que l'urée ajoutée dans une proportion de 0,50 pour 1.000 à la solution de KNOPP, agit comme toxique sur ces végétaux. Selon l'auteur ces effets toxiques seraient dus à la destruction de la chlorophylle par l'ammoniaque provenant de l'hydrolyse de l'urée. Dans une nouvelle publication (182), l'auteur insistait sur la toxicité du persulfate de potassium. Enfin, LOEW (97), la même année, publiait le premier travail sur l'action des terres rares sur les végétaux.

Les travaux de K. ASO (3) et ceux de M. NAKAMURA (143) montrent que certains composés, toxiques à certaines doses, peuvent agir comme stimulants lorsqu'on les utilise à doses moins élevées. C'est ainsi qu'après avoir observé que le fluorure de sodium et, surtout, le fluosilicate de sodium étaient toxiques pour les végétaux, Aso découvrait qu'à de plus faibles concentrations ces corps stimulaient la croissance. Avec 0 gr. 02 de fluorure de sodium dans 8.000 grammes de sol, il obtenait un *Pêdicellaria* de 84 centimètres de haut alors qu'une autre plante, dans un sol ordinaire n'avait que 75 centimètres. En 1904, le même auteur faisait paraître des recherches, du même ordre, sur l'action stimulante du bromure de potassium; le bromure de potassium, à la concentration de 10 mmg. par litre de sol, stimulait le développement du haricot et du riz. L'auteur comparait les hauteurs moyennes des plants arrosés avec des solutions de bromure de potassium avec celles des plans témoins. La hauteur des plants de riz était de 87 cm., 6 en moyenne dans le sol bromuré et seulement de 81 centimètres dans le sol ordinaire. À 500 mmg. par litre de sol, le bromure de potassium agissait comme stimulant sur le haricot et comme toxique sûr le riz. En 1906, ASO ne re-

trouvait rien de semblable en étudiant l'influence des formiates et des acétates. Des plants de Sorgho ayant atteint 30 centimètres étaient tués en cinq jours, lorsqu'ils étaient transportés dans une solution de formiate de potassium à 0,50 %, et en huit jours dans une solution d'acétate de sodium à 0,50 %. Dans une solution à 0,10 % d'acétate de calcium, des plants de pois étaient encore normaux après vingt jours, mais il étaient tués en cinq jours dans une solution à 0,50 % de ce sel.

En 1907, enfin, l'auteur montrait que le naphthalène, à des concentrations comprises entre 0,005 et 0,01 %, stimulait le développement des plantes et devenait nuisible lorsque sa concentration atteignait 0,50 %. NAKAMURA (142), en 1904, découvrait des propriétés stimulantes, pour les végétaux, aux sels de lithium et de coesium, à la concentration de 100 mmg. pour 1.000 grammes de sol.

M. KANDA (79), la même année, apportait quelques idées intéressantes sur les modalités de l'action des sels métalliques, suivant qu'ils agissent en simples solutions aqueuses ou mélangés au sol; ainsi, le sulfate de cuivre était nuisible aux jeunes pousses de pois même à grandes dilutions dans l'eau distillée, alors que dans le sol, même en grande quantité, il agissait comme stimulant. Il en était de même avec le sulfate de zinc, dont l'action diffère suivant qu'il est en solution dans l'eau distillée ou dans le sol. Le fluorure de sodium de 0,0002 % à 0,002 % exerçait une action stimulante, mais devenait toxique à partir de 0,02 %.

Cependant l'activité des recherches ne se ralentissait pas en Europe et des travaux variés continuaient à paraître, que nous sommes obligés de citer souvent sans autre lien que leur place chronologique :

SPARTSEHL (191), en 1904, montrait que l'eau de chlore accélérât la germination de diverses semences; et que cette action serait due plus à la formation d'acide chlorhydrique qu'à celle d'oxygène naissant. PAUL BECQUEREL (11), en 1905, s'intéressait aux altérations du pouvoir germinatif des graines soumises aux basses températures. H. MOLLIARD (134), en 1906, étudiait les modifications de la morphologie des feuilles sous l'action de quelques hydrates de carbone. ALEXANDRE HÉBERT (68), en 1907, se basant sur leur toxicité vis-à-vis de l'*Aspergillus niger*, classait par ordre d'activité le zircorium, le thorium, le chrome, l'aluminium, le cérium, le lanthane et le magnésium.

K. SEELANDER (186), en 1909, s'intéressait à l'action de l'oxyde de carbone sur les jeunes racines de lupin blanc, les semences de pois et des cryptogames. L'oxyde de carbone arrêtait le développement des plantes; sur le lupin blanc, par exemple, son action était sensible jusqu'à 1/2 %; l'auteur classait l'oxyde de carbone parmi les poisons anesthésiques.

C'est en 1898 que paraissaient les premiers travaux d'HENRI COUPIN (34); ils allaient s'étendre sur une dizaine d'années pendant lesquelles l'auteur étudia la toxicité de nombreux composés à l'égard des végétaux. Il utilisait des graines de différentes espèces qu'il faisait germer et laissait croître dans des

solutions de plus en plus concentrées en produits actifs; un témoin était cultivé dans l'eau distillée. COUPIN notait les concentrations qui ralentissaient ou inhibaient la croissance de ces graines. En 1901 (37), il introduisait dans l'expression de ses résultats, une donnée nouvelle jusqu'ici, la notion de ce qu'il appelait « l'équivalent toxique ». L'équivalent toxique était la plus faible concentration qui arrêta toute croissance. Cette notion lui permettait d'intéressantes comparaisons.

Dans de premières expériences sur le pois, le lupin et le maïs, l'auteur montrait que le chlorure de sodium inhibe le développement de ces plantes dès 1 gr. 20 à 1 gr. 90 %; son action nuisible est encore sensible à 0 gr. 50 %. Il étudiait ensuite l'action des sels de cuivre sur le blé. Tous les sels examinés présentaient la même toxicité, toxicité élevée due à l'ion cuivre, car l'influence des anions Br, Cl, SO_4 n'intervenait que pour des concentrations plus fortes. D'une façon générale, une solution à 0,005 % d'un sel de cuivre amenait la mort du blé. Le chrome, sur lequel il travaillait peu après, était « surtout toxique à l'état « d'acide chromique libre ou combiné; il l'était beaucoup moins « quand il jouait le rôle électropositif ». Enfin COUPIN (39) déterminait les équivalents toxiques des sels de nickel, de cobalt, d'argent, de mercure, d'or et de platine. Il lui était alors possible de comparer le pouvoir toxique de quelques composés minéraux à l'égard des végétaux supérieurs avec leur puissance antiseptique.

En rapprochant les résultats de ses travaux des chiffres donnés par MIQUEL, COUPIN pouvait conclure : « les composés « minéraux, ayant un pouvoir antiseptique élevé, sont, en même temps, à de rares exceptions près, des poisons violents « sur les végétaux supérieurs; les composés minéraux ayant un « pouvoir antiseptique peu élevé ne sont pas forcément peu « toxiques sur les végétaux supérieurs ». Les derniers travaux de HENRI COUPIN (40), en 1910, se rapportaient à l'influence de diverses substances volatiles sur les végétaux supérieurs. Après vingt-quatre heures d'immersion dans l'eau, des grains de blé étaient mis à germer dans la sciure de bois lavée. Quand les plantules étaient assez longues, l'auteur les plaçait sous une cloche en même temps que le produit volatil à saturation dans l'air. L'auteur passait en revue ainsi l'action d'un grand nombre de corps volatils comme divers solvants organiques : l'acétone, les alcools méthyliques, éthyliques, amyliques, le bromoforme, le chloroforme etc...; des acides : l'acide chlorhydrique, l'acide acétique, l'acide cyanhydrique etc...; des essences : essences de thym et d'eucalyptus; des phénols : créosote, gaiacol, phénol.

En 1910, L. MAQUENNE et E. DEMOUSSY (126) prenaient comme critérium de la mort du protoplasme le noircissement de certaines feuilles vertes provoqué par l'action des diastases végétales libérées sur divers composés. De feuilles d'*Aucuba* et de troènes étaient placées dans des solutions à étudier et on notait le temps nécessaire à l'apparition du noircissement; il est à noter que dans l'eau pure les feuilles se conservaient pendant six à huit semaines. Dans ces conditions, les sels d'ammonium étaient

beaucoup plus toxiques que les sels alcalino-terreux dont la toxicité augmentait du calcium au baryum. La présence du baryum était constatée par H. COLIN et J. DE RUF (28) dans diverses plantes (pois, maïs, haricots et blé) cultivées dans des solutions étendues d'azotate de baryum. Il se formait dans les racines, au niveau du péricycle, un précipité granuleux et abondant, de nature vraisemblablement barytique et le baryum n'était pas réparti uniformément dans la plante.

HILBARD (71) publiait, en 1913, un travail curieux sur l'action anti-toxique de l'hydrate de chloral vis-à-vis du sulfate de cuivre. Il disposait des graines de pois, déjà germées, sur des blocs de paraffine qui flottaient sur les solutions à étudier, de façon que seules les racines baignent dans les solutions. Dans chacune des solutions de sulfate de cuivre trempaient cinq jeunes racines, les concentrations étaient réparties entre 0,0003 et 0,000.0025 mol. pour 100; cinq autres graines étaient cultivées dans chacune des solutions de chloral hydraté de M/166,6 à M/16.550; cinq autres, enfin, dans des solutions de sulfate de cuivre et d'hydrate de chloral. La croissance était nettement plus accentuée quand les deux sels étaient réunis.

Enfin, pour terminer cette énumération nous insisterons davantage sur les travaux de TH. BOKORNY (15), parus en 1913.

TH. BOKORNY recherche l'action stimulante ou inhibitrice de nombreux produits sur les végétaux. Sa méthode est simple : il fait germer sur un fond de papier-filtre des graines d'orge, de froment, de cresson, de raifort, de haricot et de lin; le papier-filtre est imprégné de la solution à étudier, la même quantité de solution est utilisée pour un même nombre de graines. L'auteur n'ajoute aucun liquide nutritif afin que la substance introduite puisse agir aussi bien comme nourriture que comme toxique. En même temps il fait une série de contrôle dans l'eau distillée. La durée de l'épreuve est de dix jours. Le produit envisagé exerce une action stimulatrice lorsque les séries d'étude survivent aux plantes témoins; si toutes les plantes s'étiolent ensemble, le produit est inactif à la concentration envisagée; si les plantes d'étude meurent les premières, le produit est toxique.

Les travaux de BOKORNY ont porté sur une multitude de composés minéraux et organiques (sels alcalins et alcalino-terreux, sels de métaux lourds, acides minéraux et organiques, bases organiques, alcools divers etc...). Parmi les principaux résultats obtenus nous retiendrons ce fait que les sels habituellement considérés comme nutritifs deviennent toxiques à hautes doses. Ainsi, le chlorure de potassium serait nuisible dès 0,25 %, le nitrate de potassium dès 1 %, le nitrate d'ammonium est très toxique ainsi que les sels d'ammonium en général. De plus TH. BOKORNY essaie d'expliquer la toxicité de différents corps. L'action toxique des sels neutres de coesium et de lithium sur les jeunes pousses reposerait sur une réaction du poison avec les protéines du plasma. L'influence nocive des autres produits serait probablement due à la précipitation du calcium (oxalate), à l'acidité (acides), à l'action sur les groupes amides (aldéhydes), sur les groupes protéines (bases organiques) ou à l'oxy-

dation du plasma (oxydants). Enfin, certaines substances réputées toxiques ont, pour des concentrations choisies, une action stimulante (sulfate de coesium à 0,01 %, sulfate de lithium à 0,05 %, sulfate de plomb à 0,02 %). De sorte que BOKORNY considère que, vraisemblablement, tous les toxiques employés à concentration convenable peuvent exercer sur la croissance une action favorable. Cependant, dans la pratique, où les facteurs en jeu sont très nombreux, l'action stimulante peut passer inaperçue.

Travaux de W. Sigmund sur les alcaloïdes

De tous les travaux sur l'influence des alcaloïdes sur les végétaux, que nous avons rencontrés jusqu'ici, ceux de W. SIGMUND (189), parus en 1914, présentent le plus grand intérêt pour la suite de ce travail. Avant de les passer en revue, nous rappellerons rapidement les recherches entreprises par quelques auteurs sur des sujets voisins.

CORDIER (31), en 1906, étudiait l'influence de la strychnine sur les végétaux. Il opérait aseptiquement, en plaçant des graines, lavées à l'eau stérile, sur du coton hydrophile imprégné de la solution à étudier; il pesait les récoltes obtenues et constatait ainsi que des concentrations de sulfate de strychnine de 1 pour 10.000 à 1 pour 5.000 n'exerçaient aucune action, des solutions à 1 pour 1.000 ou 2 pour 1.000 étaient déjà nuisibles. Avec une solution à 1 pour 200 on n'assistait plus qu'à un début de croissance, enfin une concentration de 1 pour 100 empêchait la germination.

R. OTTO et W. KOOPER (150), en 1910, montraient que la nicotine, à la concentration de 3 %, favorisait le développement du *Nicotiana tabacum* et du *Solanum tuberosum*. La teneur en alcaloïdes de ces plantes se trouvait augmentée. En 1913, D'IPPOLITO (45) poursuivait des recherches sur l'immunité dont jouiraient certaines plantes supérieures, ou du moins certains de leurs organes vis-à-vis de leurs propres alcaloïdes. Des feuilles de *Conium* restaient vivantes, quand on les plongeait pendant dix-huit heures dans une solution de conine à 1 %; un *Delphinium* trempé pendant vingt heures dans une solution de delphinine n'était pas incommodé.

W. SIGMUND utilisait des graines de vesce, de pois, de froment, d'orge, de colza, de moutarde noire, de moutarde blanche et de lupin jaune.

Ces graines, tirées d'un même lot, étaient triées, les petites et les plus grosses étaient rejetées. Elles étaient mises à gonfler, sur un fond de papier-filtre, dans la solution à étudier pendant vingt-quatre à quarante-huit heures; après quoi, cette solution

était décantée et remplacée par de l'eau distillée en quantité suffisante pour imprégner convenablement le papier-filtre. Parfois la solution à étudier n'était pas décantée et le fond de papier-filtre en restait imprégné tout le temps de l'expérience.

Les graines germaient et l'auteur faisait d'abord un pourcentage des graines qui avaient germé. Il mesurait ensuite les racines et les tiges à des intervalles de temps réguliers; toutefois il ne tenait compte que des pousses moyennes, il éliminait les courtes et les plus longues. L'expérience était arrêtée lorsque les plantes restaient stationnaires, c'est-à-dire après environ quatorze jours. Ces résultats pouvaient être comparés aux chiffres donnés par une série témoin qui avait trempé dans l'eau distillée. Les plantes témoins atteignaient alors de 25 à 55 mm. pour les tiges de pois par exemple.

L'auteur ajoute qu'il est bon d'opérer à l'abri des vapeurs nuisibles.

W. SIGMUND a étudié un grand nombre d'alcaloïdes et quelques composés organiques comme la nicotine, la piperidine, la piperine, la pyrroline, la pyrrolidine, l'atropine, la tropine, l'acide tropique, l'acide atropique, l'hyoscyamine, la pilocarpine, la cocaïne, la benzoylecgonine, l'ecgonine, la lupinidine, la lupinine, la sparteïne, la cytosine et bien d'autres.

Les résultats concernant la cocaïne et ses produits de doublement nous intéressent particulièrement. « Le chlorhydrate de cocaïne n'a aucune action sur la germination et la croissance, à la concentration de 0,136 % (M/250); mais à 0,339 % (M/100) il retarde notablement le développement des vesces et de l'orge. A 0,678 % (M/50) le pourcentage de germination des graines de vesces, de pois et moutarde n'est pas abaissé, mais le développement ultérieur des germes est ralenti. Si, au lieu de vingt-quatre heures, on laisse tremper les graines pendant quarante-huit heures dans cette solution, le nombre des graines ayant germé est très diminué et la croissance est ensuite très retardée. » La benzoylecgonine n'a aucune influence fâcheuse à 0,116 % (M/250) sur le blé, sur le colza et le pois. Son action est encore peu marquée à la dose de 0,289 % (M/100). Le retard s'accroît à 0,578 % (M/50) et devient particulièrement sensible à 1,156 % (M/25). L'ecgonine est moins nuisible que la benzoylecgonine : la croissance est restée normale sous l'action de concentrations plus élevées.

W. SIGMUND a réuni ses résultats dans une série de tableaux; dans l'un de ces tableaux en particulier, qui résume les chiffres obtenus avec des solutions d'alcaloïdes à 1/25 mol., nous avons trouvé des renseignements intéressants : au cinquième jour de l'épreuve, 96 % des témoins (vesce) avaient germé, les racines avaient de 22 à 32 mm. de long; 85 % des graines trempées dans la solution de chlorhydrate de cocaïne avaient germé; mais à la place des chiffres qui mesurent les longueurs des racines l'auteur a écrit « rabougri », c'est-à-dire qu'au cinquième jour de l'épreuve les germes étaient morts, 90 % des graines de la solution de benzoylecgonine avaient germé et les pousses mesu-

raient de 17 à 26 mm.; dans la solution d'ecgonine, 90 % des graines avaient germé et mesuraient de 20 à 32 mm.

Nous aurons, par la suite, l'occasion de revenir sur ces résultats et d'étudier plus amplement les tableaux de W. SIGMUND.

TRAVAUX RECEMMENT PARUS

Après une période d'interruption du fait de la guerre mondiale, des travaux très nombreux ont paru durant ces dernières années.

Il nous paraît possible de les réunir, suivant leur nature, en quelques groupes principaux : action des sels minéraux, des composés radioactifs, des anesthésiques généraux, des alcaloïdes et de différents composés organiques sur les végétaux.

Action des éléments minéraux

Quelques auteurs ont poursuivi l'étude de l'influence des sels minéraux sur les plantes.

H. KALHO (78), en 1921, établit une classification des métaux lourds suivant leur toxicité sur les végétaux. Les sels de mercure, de cuivre, de zinc et de plomb seraient les plus toxiques; ensuite viendraient les sels de cobalt, de manganèse, de cadmium, de nickel et de calcium. Cet ordre de toxicité est à peu de chose près celui qui avait été retenu par COUPIN.

KWASSNIKOF et PARFENTJEW (86), en 1926, montrent que l'arséniate de sodium, à certaines concentrations, peut être rangé parmi les corps doués de propriétés stimulantes sur la croissance des végétaux. B. BLAIR (13), et ses collaborateurs, étudient l'action du plomb, du cuivre, du zinc et du calcium sur des bulbes de jacinthe. J. L. COLLINS (30), en 1931, insiste sur la résistance des feuilles d'*Elodea* dans des solutions de chlorure de baryum, de sulfate de magnésium, d'acide formique, de nitrate d'argent et d'alcool éthylique.

PORT JEAN (156), en 1932, constate d'abord que la croissance des plantules d'avoine présente un léger optimum entre pH 4,50 et pH 5,25, et un fort optimum entre pH 6,25 et pH 8,00. Il établit ensuite un ordre de toxicité entre divers sels employés à la concentration de M/10. Les sels de lithium, d'ammonium et de baryum sont les plus toxiques, puis viennent les sels de cal-

cium, de potassium, de sodium et de magnésium. L'action retardatrice des anions est conforme à la série lyotrope :



Pour des dilutions plus grandes l'action diffère avec les espèces de plantes. Pour des concentrations de 0,0001 %, par exemple, l'action devient favorisante en particulier avec les sels de lithium, d'ammonium et de baryum.

KARL SCHMALFUSS (185), l'année suivante étudie l'influence exercée par la proportion des ions potassium, calcium, magnésium et fer, contenus dans un milieu nutritif, sur le développement des tiges et des racines. La chlorose, par défaut de fer, est aggravée par les phosphates et le calcium qui limitent la solubilisation de ce métal.

Le bore et ses composés ont été étudiés en particulier par HASELHOFF (67) qui, dès 1913, trouve que l'acide borique et le borate de sodium sont toxiques pour les végétaux. Leur action est sensible dès un milligramme de bore par litre. HAAS (66), en 1929, observe de même que l'acide borique est toxique à de très faibles concentrations, toutefois le sulfate de fer agirait comme antidote; ce qui expliquerait peut-être les résultats de T. R. SWANBACK (201). Ce dernier auteur, en cultivant, en 1927, de jeunes pousses de tabac dans le liquide nutritif de SHIVE, renfermant en outre 0,0008 ‰ de sulfate de fer, constate, en effet, après soixante et quatre-vingt-dix jours de culture que l'addition d'acide borique dans les proportions de 1 pour 500.000 favorise la croissance.

Les travaux de G. BOHN et A. DRZEWINA (14), parus en 1932, sont assez particuliers.

Après avoir rappelé les expériences de RAULIN sur l'*Aspergillus niger* qui ne se développe pas dans un récipient d'argent, les auteurs font croître des graines en présence d'argent métallique. Des graines sont mises à germer dans des boîtes de PETRI, sur un fond de papier-filtre humecté d'eau. Après vingt-quatre heures, lorsque les graines sont suffisamment gonflées, les auteurs portent la moitié de ces graines dans une seconde boîte de PETRI qui contient une petite quantité d'eau distillée et dont le fond est tapissé avec un petit disque découpé dans une mince feuille d'argent. La première boîte de PETRI, avec l'autre moitié des graines, constitue le témoin. G. BOHN et A. DRZEWINA constatent ainsi une très forte accélération de la croissance du Cresson alénois. Des graines de Cresson alénois, après trois jours de culture, sur un fond d'argent ont mesuré 55, 50 et 37 mm. en moyenne alors que les témoins sur papier-filtre ne mesuraient que 11, 7 et 5 mm. Les auteurs se sont demandés quel était le mécanisme de cette accélération; ils ont fait germer pour cela des graines dans une eau qui avait séjourné trois à huit jours sur de l'argent, la germination n'a été que normale. C'est bien le contact de l'argent qui est nécessaire pour provoquer l'accélération en question. En effet, lorsqu'on met dans un boîte de PETRI un demi disque d'argent, les graines portées sur ce demi

disque donnent des plantules de deux à trois fois plus grandes que celles qui sont fournies par les graines placées dans la même boîte, mais sur le papier-filtre.

Les auteurs ont utilisé pareillement des graines de tabac, en les laissant germer sur du papier, puis en les portant sur le fond d'argent. Ils ont ainsi constaté une inhibition de la croissance des racines, et, en même temps, un développement plus important des cotylédons. Le long de l'axe hypocotyle sont apparus, très tôt, des poils sécréteurs de nicotine et la venue de la première feuille était très avancée.

Action des composés radio-actifs

L'influence des corps radio-actifs et des différentes radiations sur les végétaux a fait l'objet de quelques travaux. Dès 1913, MOLISCH (134) envisage la possibilité d'utiliser le radium en vue du « forcing » des plantes. JULES STOKLASA (196) trouve pareillement des propriétés stimulantes au plomb, au radium et à l'uranium, en 1922, et attribue au sélénium une action nocive. P. CORNET et ED. GILLES (32), en 1932, s'intéressent à l'action des rayons ultra-violets sur les végétaux. Mlle MINA EGNUS (49) irradie des plantes à l'aide de 10 mmg. de bromure de radium à 12,5 mm. La croissance terminale est arrêtée sans que la plante meure; par compensation, les poils radicaux s'allongent. L'oxyde noir d'uranium incorporé au sol, provoque, d'après MOUTET (142) une stimulation de la croissance par son rayonnement. Sans doute toutes ces variations s'expliquent-elles par une question de doses.

Action des anesthésiques généraux

Les anesthésiques généraux et leur influence sur les végétaux ont encore intéressé quelques auteurs :

KOCH (83), en 1911, montre que l'éther et le sulfure de carbone exercent une action stimulante sur la germination. L'acétylène, selon GRAF et RICHTER (62) diminue la formation des substances de réserve.

G. A. VACHA (208), en 1927, en collaboration avec HARWEY, entreprend des recherches systématiques sur l'action stimulante de l'éthylène, du propylène et de l'oxyde d'éthyle, sur diverses sortes de pommes de terre. L'éthylène et le propylène accélèrent la germination; l'éther, au contraire, la retarde.

Enfin WALLACE (214), en 1933, observe que l'éther et l'acétylène anesthésient des plants de *Mimosa pudica*, d'*Oxalis stricta*

et de *Marsilea macropus*; les feuilles ne se ferment plus et ne réagissent plus. Le chloroforme, l'éthylène et l'oxyde d'azote, même à doses toxiques, n'ont aucune action de ce genre.

Action des alcaloïdes et de différents composés organiques

L'action des alcaloïdes sur les végétaux inférieurs a fait l'objet des recherches de P. NOBECOURT et de MEZZACHOLI et AMATI.

P. NOBECOURT (146), en 1921, étudie l'action de quelques alcaloïdes sur le *Botrytis cinerea*. La nicotine et l'atropine n'ont aucune action, la quinine est nuisible à haute dose, l'aconitine est de beaucoup l'alcaloïde le plus toxique. G. MEZZACHOLI et A. AMATI (131) poursuivent des recherches similaires sur l'*Aspergillus niger*. Les alcaloïdes étudiés sont la caféine et la quinine. Le sulfate de quinine à des concentrations variant de 0,50 à 3 0/00 favorise le développement de l'*Aspergillus niger*. La caféine, à la dose de 0,05 %, exerce une action inhibitrice et le nitrate de strychnine, ajouté au milieu de culture dans une proportion de 5/1000, exerce également une influence favorable mais moins marquée que celle du sulfate de quinine. Enfin, tandis que la caféine ralentit le métabolisme des glucides, les deux autres alcaloïdes facilitent leur consommation.

Enfin en 1934, paraissent les travaux de N. STADNITSCHENKO (192) sur l'action de la cocaïne sur les levures qui réussissent à vivre dans des milieux dont la concentration en cocaïne est inférieure à 5 %.

Un certain nombre d'auteurs ont étudié l'influence de diverses substances organiques sur les plantes.

P. GUÉRIN et CH. LORMAND (165), en 1920, constatent que « la plupart des plantes maintenues 1 heure, parfois 2 heures, dans une atmosphère à 1/2000 de chlore, palite, bromacétone, chloropicrine, ypérite, résistent à l'action de ces corps; elles perdent leurs feuilles, mais de nouvelles apparaissent après un temps plus ou moins long et la plante finit par reprendre sa végétation normale ».

G. NICOLAS (144), en 1921, publie ses premières recherches sur l'hexaméthylènetétramine, qui, toxique à de fortes doses, favorise le développement du haricot et augmente le poids des récoltes à faibles concentrations. De même le formol à la concentration de 321 mmg. pour 1000, soit 125 mmg. d'aldéhyde formique, est un aliment pour le pois, le haricot et le maïs. L'action stimulante de ces deux corps est visible lorsqu'on examine le bois secondaire en particulier. En outre, l'hexaméthylènetétramine et l'aldéhyde formique activent l'amylogénèse. Ch. RICHET (173) retrouve cette action stimulante en étudiant l'action des formiates de sodium et de calcium sur le blé et l'orge. Ces corps, sans augmenter le poids de chaque plante, permettent la germi-

nation d'un plus grand nombre de graines. Le formol, d'après J. DUFFRENOY et A. RADOEFF (47), en 1932, ne jouirait pas de ce pouvoir d'activer la germination. La germination des graines de tabac que ces auteurs avaient plongées pendant 15 minutes dans une solution de 5 cm³ de formol additionnée de 50 cm³ d'eau distillée est simplement normale. Plongées dans le formol à 40 % les graines n'ont pas germé.

L'influence de divers acides organiques sur les végétaux a été étudiée, en 1931, par COGGESHALL (27). Cet auteur cultive d'abord pendant un certain temps dans la solution de SHIVE des graines de lupin blanc. Ces germes sont ensuite portés dans les solutions à étudier qui contiennent à côté des trois sels de SHIVE (phosphate de potassium, sulfate de magnésium et nitrate de calcium) de l'acide acétique, de l'acide propionique, de l'acide butyrique normal, de l'acide sulfurique ou de l'acétate de potassium à diverses concentrations.

Ils y restent de 18 à 23 heures, ce que l'auteur appelle le « temps d'épreuve », puis ils sont placés enfin 10 nouvelles heures dans la solution de SHIVE normale : c'est le « temps de repos ». Les accroissements mesurés pendant ces deux périodes sont comparés aux accroissements des témoins. Quelques essais ont même été faits dans l'eau distillée.

Pendant le temps d'épreuve, l'acide acétique exerce une action retardatrice d'autant plus forte, que les concentrations sont plus élevées. Il est nuisible aux fortes et aux faibles concentrations et reste sans action pour des dilutions moyennes. En solution dans l'eau pure, l'acide acétique est stimulant à faibles doses et nuisible pour des concentrations plus élevées. Pendant le temps de repos l'auteur trouve une influence favorable pour les acides acétique et propionique et pour l'acétate de potassium agissant à faible dose. L'action de l'acide butyrique et de l'acide sulfurique est incertaine.

Si l'on appelle toxicité relative la concentration qui retarde de 50 % la croissance des plantes traitées vis-à-vis de celle des témoins et si l'on adopte comme unité le chiffre trouvé pour l'acide acétique, les différents corps expérimentés présentent, d'après COGGESHALL les toxicités relatives suivantes : acétate de potassium 0,25, acide propionique 2,34, acide sulfurique 4, acide butyrique 4,59. Enfin l'auteur pense que le pH ne peut être pris comme critérium de la toxicité des acides quoique son rôle soit indiscutable.

L'influence des colorants sur les végétaux a retenu l'attention de A. EICHORN (50), en 1930, et de A. RADOEFF, en 1932. A. EICHORN considère le bleu de méthylène comme toxique au plus haut degré tandis que le rouge neutre ne l'est pas. A. RADOEFF (157) fait tremper des graines de riz dans des solutions pendant un certain temps, les lave ensuite et les met à germer dans l'eau distillée. Il pèse les tiges sèches, soit après 4 jours, soit après 8 jours. Il étudie de la sorte l'influence des colorants vitaux comme le rouge neutre, le vert de méthyle, le violet de crésyl, etc. Il poursuit en outre des recherches du même ordre sur les polyphénols et divers oxydants minéraux et organiques.

J. SELLEI (188) recherche comment certaines substances colorantes : série de l'aniline, bleu de méthylène, alizarine et en particulier les solutions fluorescentes influencent le développement des germes et des plantes.

Quelques auteurs ont étudié l'action des hormones sur les végétaux. SILVIO REBELLO (160), en 1934, fait croître des bulbes de jacinthe dans des solutions d'adrénaline, de pituitine, d'extrait d'hypophyse et de corps thyroïde. O. V. HYKES (73), en 1933, étudie pareillement l'influence de quelques hormones sur la feuillaison et le développement des végétaux.

Des branches culminantes, de mêmes longueurs et de mêmes poids, taillées au début de février sur des cerisiers, des peupliers, des saules et des marronniers, sont placées directement dans des solutions d'adrénaline, de thyroxine, d'hypophyse et d'insuline. Ces solutions sont contenues dans des éprouvettes et maintenues entre 16° et 20°. On suit le bourgeonnement des feuilles et des fleurs et, chez le saule et le peuplier, l'apparition des racines. La thyroxine est la plus active. La thyroxine, l'adrénaline, l'hypophysine, stimulent le développement des racines, principalement en ce qui concerne leur nombre. L'influence sur la feuillaison est parallèle à l'influence sur les racines.

SCHICK (184), en 1920, fait tenir à des femmes des fleurs coupées d'anémones et de chrysanthèmes. Il constate que les fleurs se fanent plus vite quand les femmes qui les portent sont dans leurs périodes menstruelles. Un principe toxique, que l'auteur appelle « ménotoxine », passerait du sang dans la sueur et en serait la cause. D. I. MACHT reprendra d'ailleurs plus tard ces recherches. KOGL HAAGENS et ERXLEBEN H. (84) d'une part, en 1934, et d'autre part, THILMAN KENNETH V. et KÖPFELI J. (205) en 1935, rejoignent les conclusions de HYKES sur l'influence stimulante des hormones vis-à-vis des plantes.

En 1934, KENNET W. (81) utilise comme critérium de toxicité l'exosmose des électrolytes à partir de disques de pommes de terre, provoquée par les substances étudiées; il montre ainsi que la toxicité des elhers dans la série aliphatique augmente avec le nombre des atomes de carbone.

Enfin en 1934, D. GIBBS (59) étudie l'action inhibitrice de 13 alcools aliphatiques normaux sur la croissance des racines de diverses semences; ses résultats ne coïncident pas avec ceux de D. I. MACHT.

TRAVAUX DE D. I. MACHT

Nous nous étendrons plus longuement sur les travaux de D. I. MACHT en raison de leur importance et de l'intérêt qu'ils présentent pour nos recherches. MACHT a mis au point une tech-

aique qui lui permet d'étudier l'influence de substances extrêmement variées sur la croissance du lupin blanc. La simplicité de cette méthode, jointe à la sensibilité que MACHT lui attribue, nous a incité à l'étudier en détail et finalement à l'adopter.

Les premières recherches de MACHT datent de 1922, en collaboration avec M. B. LEVINGSTON (107), il fait alors paraître un travail important sur la toxicité, vis-à-vis du lupin blanc, de la cocaïne et de ses produits de dédoublement. Le mode opératoire adopté, sur lequel nous reviendrons plus longuement dans un autre chapitre, est le suivant :

Des graines de lupin blanc préalablement gonflées par une immersion de 24 heures dans l'eau ordinaire sont mises à germer sur un lit de mousse humide à la température de 20°.

Lorsque les germes ont atteint de 25 à 35 mm. de longueur, ce qui demande généralement de 2 à 3 jours, on mesure soigneusement la longueur des jeunes racines, et les graines sont portées dans les solutions à étudier. Ces solutions sont placées dans des séries de tubes à essai et les graines sont posées sur les bords de ceux-ci de façon que, seules, les jeunes racines baignent dans le liquide; on laisse le tout pendant 24 heures à une température de 20° et on note, au bout de ce temps, les nouvelles longueurs des racines. L'accroissement ainsi observé est comparé à celui des plantes témoins croissant à la même température. Pour obtenir des moyennes convenables, chaque essai nécessite une dizaine de graines.

Le liquide de culture utilisé pour les graines témoins est constitué par la solution de SHIVE (solution étendue de phosphate monopotassique, d'azotate de calcium et de sulfate de magnésium) diluée avec un égal volume d'eau distillée. Les solutions à étudier sont également additionnées, au moment de la mise en culture, d'un volume égal de cette même solution de SHIVE. Il semble bien que dans tous les cas, le titre en principe actif donné par les auteurs pour les solutions examinées représente la concentration du principe actif dans ce dernier liquide de culture, c'est-à-dire dans la solution primitive diluée au demi par addition du mélange nutritif.

Dans la première publication D. I. MACHT et M. B. LEVINGSTON étudient l'action du chlorhydrate de cocaïne, de la benzoyl-ecgonine, du chlorhydrate d'ecgonine, du benzoate de méthyle, du benzoate de sodium et de l'alcool méthylique sur les lupins blancs. Le chlorhydrate de cocaïne employé est un sel chimiquement pur; à la concentration de 2 %, soit 0,06 mol. $\%$, il inhibe toute croissance, et, pour une solution à 1,70 %, soit 0,05 mol. $\%$, l'allongement moyen des racines ne représente que 64 % de l'accroissement des témoins. Pour des concentrations plus faibles, l'influence est nulle; dans quelques expériences pour des dilutions de 0,003 % (0,0001 mol. $\%$) à 0,000017 % (0,0000005 mol. $\%$) on eut l'impression d'une stimulation de la poussée, ce ne fut toutefois pas définitivement établi par suite du manque de cocaïne.

Le chlorhydrate d'ecgonine, beaucoup plus toxique que le chlorhydrate de cocaïne, arrête la croissance du lupin dès 0,0025 mo-

lécule ‰ et son action retardatrice est sensible jusqu'à 0,0011 pour cent. Au contraire, la benzoylecgonine est moins toxique et n'arrête le développement des germes qu'à la dose de 3,29 ‰ et dès 0,329 ‰ la croissance n'est plus ralentie.

La concentration minima toxique, c'est-à-dire la plus faible concentration qui inhibe la poussée des jeunes racines, est de 4,80 ‰ pour l'alcool méthylique. A partir de 0,96 ‰ ce corps est inactif. Il agirait même plutôt comme stimulant vers 0,32 ‰.

Le benzoate de méthyle est très nocif, sa concentration minima toxique est égale à 0,014 ‰ et ce composé fait sentir son influence retardatrice pour toutes les concentrations supérieures à 0,00007 ‰. Enfin le benzoate de sodium représente le corps le plus toxique, puisqu'il tue les plantes dès la concentration de 0,007 ‰.

D. I. MACHT et LEVINGSTON étudient en outre les effets des mélanges de ces différents produits sur le lupin. Un mélange de benzoate de sodium, d'alcool méthylique et chlorhydrate d'ecgonine dans lequel chaque produit entraine pour un tiers de sa concentration minima toxique est plus toxique que la théorie ne le prévoyait. Au contraire, un mélange de chlorhydrate d'ecgonine et de benzoate de méthyle composé d'une demi-dose minima toxique de chaque élément est moins toxique qu'il ne devrait l'être.

En comparant les résultats ainsi obtenus avec les données résultant de différents essais sur les animaux, (travaux de BLUM et MACHT sur les effets de la cocaïne et de ses produits de dédoublement sur le système nerveux central, travaux de KUBOTA et MACHT (106) sur l'anesthésie locale et sur le temps de paralysie du muscle strié; travaux de MACHT et SATANI sur le temps de paralysie du muscle lisse, et enfin essai de HEFFTER (69) sur la toxicité du chlorhydrate de cocaïne et de ses produits de dédoublement sur le chat), les auteurs arrivent aux conclusions suivantes : parmi tous les corps étudiés le chlorhydrate de cocaïne est de beaucoup le plus toxique pour les animaux. Sa toxicité sur les végétaux est beaucoup moins marquée. Le chlorhydrate d'ecgonine, très toxique sur les tissus animaux, est beaucoup plus actif que le chlorhydrate de cocaïne sur le lupin. La benzoylecgonine est moins toxique que le chlorhydrate d'ecgonine pour le iupin et pour l'animal. L'alcool méthylique n'est toxique ni pour l'animal, ni pour la plante. Enfin, tandis que le benzoate de sodium est à peu près dépourvu de toxicité pour les animaux, il suffit d'une très faible proportion de benzoate de méthyle ou de benzoate de sodium pour empêcher la croissance du lupin blanc.

En 1929, sous la signature de D. I. MACHT et H. LEACH (116) paraît un nouveau travail.

Des recherches antérieures, en particulier celles de D. I. MACHT et ANDERSON (112) avaient montré que la lumière polarisée, les rayons ultra-violets et les rayons infra-rouges altèrent certains médicaments. L'importance des résultats obtenus conduisit D. I. MACHT et H. LEACH à élargir ces recherches en utilisant la cocaïne, alcaloïde dont la structure est bien connue et dont les solutions, assez facilement altérables, donnent naissance à des produits de composition définie.

Des solutions de cocaïne droite et de cocaïne gauche et de leurs chlorhydrates ont été irradiées à la lumière polarisée, soit exposées pendant le même temps à la lumière non polarisée de même intensité, soit conservées à l'obscurité. Ces solutions ont été ensuite étudiées et comparées à l'aide de techniques très variées : techniques zoopharmacologiques, techniques psychopharmacologiques, techniques phytopharmacologiques et techniques physicochimiques.

Méthodes zoopharmacologiques :

1° essai sur les poissons rouges;

2° anesthésie du *Diemyctylus viridens*;

3° anesthésie de la cornée du lapin;

4° essai de la toxicité sur la souris, le rat blanc et le cobaye;

5° essai de la toxicité sur les tissus animaux isolés.

D'une façon générale les solutions de cocaïne témoins sont plus toxiques et plus anesthésiantes que les mêmes solutions soumises à l'action de la lumière polarisée; l'exposition à la lumière non polarisée ne modifie pas, pour ainsi dire, l'activité des solutions de cocaïne.

Méthodes psychopharmacologiques :

Sous ce nom les auteurs comprennent les essais suivants : Des jeunes rats sont lâchés dans un labyrinthe circulaire, au centre duquel se trouve un appât; après quelques exercices, ces rats trouvent le chemin de la périphérie vers le centre dans un temps très court. On note alors le temps nécessaire à la course et le nombre de faux pas avant et après l'injection de cocaïne. On constate que le temps est plus long et les faux pas plus nombreux avec la solution non polarisée.

Méthodes phytopharmacologiques :

Les auteurs ont recherché l'action de ces solutions de cocaïne sur la croissance du lupin blanc en utilisant la technique décrite plus haut.

La croissance atteint 94 % de celle des témoins dans les solutions conservées à l'obscurité et seulement 83 % dans les solutions irradiées à la lumière polarisée pour des concentrations de 1/4000.

Méthodes physico-chimiques :

Les essais physico-chimiques consistent dans des mesures de pouvoir rotatoire, de pH et de point de fusion.

La déviation pour des solutions de chlorhydrate de cocaïne à 4 % à l'état frais était de $-11^{\circ}83$ en tube de 20 cm.; après une exposition de 10 heures à la lumière non polarisée elle a été trouvée égale à $-11^{\circ}77$, et après une exposition de même durée à la lumière polarisée elle est devenue $-11^{\circ}67$.

Le pH des solutions est de 4,8 pour des solutions de chlorhydrate de cocaïne fraîches à 1 % et pour les mêmes solutions soumises pendant dix heures à l'action de la lumière non polarisée; il est abaissé à 4,4 dans le cas des solutions exposées à la lumière polarisée pendant le même temps.

Enfin les auteurs ont évaporé des solutions de chlorhydrate de cocaïne, et après dessiccation des produits obtenus ils en ont déterminé les points de fusion. Ils ont trouvé que le point de fusion

de la cocaïne des solutions témoins était de 199° ; il était très voisin, 197° , dans le cas des solutions exposées à la lumière non polarisée, et sensiblement inférieur, 187° , pour la cocaïne des solutions irradiées à la lumière polarisée.

L'ensemble de ces travaux a permis aux auteurs de conclure à une action très nette de la lumière polarisée sur la cocaïne droite et sur la cocaïne gauche. Les solutions irradiées à la lumière polarisée sont moins actives que les solutions exposées à la lumière non polarisée, et celles-ci se comportent presque comme les solutions non irradiées.

On conçoit aisément l'application pratique de ces conclusions dans le domaine de la conservation des préparations de cocaïne, car la lumière polarisée n'est pas si rare qu'on le suppose. Il se fait toujours une polarisation de la lumière quand les ondes lumineuses sont réfléchies à partir d'une face plane ou traversent certains objets transparents sous un certain angle. D. I. MACHT et H. LEACH ont étudié comparativement deux solutions de chlorhydrate de cocaïne de même titre, réparties dans deux flacons identiques. L'un des flacons, enveloppé dans un papier identique à celui que l'on emploie couramment pour envelopper des médicaments, a été exposé pendant deux jours sur une fenêtre; l'autre flacon n'était pas enveloppé; des essais ont montré que ces deux solutions étaient altérées, en particulier la solution contenue dans le flacon enveloppé, et les auteurs attribuent ces altérations à la lumière polarisée.

Nous voyons donc que l'idée très neuve de D. I. MACHT, d'étudier les altérations d'un médicament à l'aide d'un test végétal donne, dans le cas du chlorhydrate de cocaïne, tout au moins, des résultats particulièrement précis et en concordance avec ceux fournis par des méthodes très différentes.

Les recherches de MACHT ont encore porté sur un certain nombre de composés.

Il peut conclure avec HYNDMAN (110), en 1924, que la glycine et la taurine n'ont aucune action toxique sur l'animal et sur le végétal. La toxicité de la bile est due à l'acide cholique; l'acide cholique, en effet, exerce une dépression très accentuée sur les réactions neuromusculaires et cérébrospinales des animaux; en outre il retarde la croissance des germes de lupin blanc. En 1931, MACHT (118) étudie l'action de certains composés organiques et inorganiques du mercure sur la croissance du lupin blanc. Les sels organiques de mercure sont beaucoup moins toxiques que les sels minéraux. Les moindres traces de sels minéraux, souvent considérées comme impuretés, communiquent aux composés organiques une grande toxicité, d'où possibilité d'y voir un critérium de la pureté de ces sels.

Dans une autre publication, l'auteur (119) montre que certaines substances toxiques pour le règne végétal jouent un rôle important dans la vie animale, et que, inversement, diverses substances toxiques pour l'organisme animal, sont favorables au végétal; dans cet ordre d'idée, il étudie l'action des amino-acides: leucine, valine, alanine et cystine.

En 1933, avec HARDEN WILTON, MACHT (121) fait paraître une

étude comparée de l'influence de trois séries de produits de condensation du phénol, de l'orthocrésol et de la résorcine avec les sept premières aldéhydes aliphatiques sur des poissons rouges, des lupins blancs, des staphyloccoques dorés, des chats et des lapins.

MACHT et MARY DAVES (123), en 1935, montrent que la nicotine B est plus toxique pour le lupin blanc que la nicotine racémique. De même la nicotine B et la narcotine B sont plus toxiques que la nicotine A et la narcotine A et la déméthylation augmente cette toxicité.

Enfin D. I. MACHT a encore recherché l'action de produits très complexes dont la structure chimique est peu ou pas connue.

En 1924, en collaboration avec D. LUBIN (108) il étudie la toxicité de la salive normale, du sérum normal, du sérum de femmes menstruant, des sécrétions cutanées ou urinaires, du lait et des larmes. La même année avec HILL (111) il montre que le sang normal, qui présente une certaine toxicité pour les jeunes racines du lupin blanc, perd cette toxicité si on l'expose aux rayons ultra-violet. Au contraire les rayons X et le radium augmentent cette toxicité primitive.

En 1928, D. I. MACHT et ANDERSON (114) mettent en évidence dans le sérum sanguin une toxine spéciale de l'anémie pernicieuse retardant la croissance du lupin. Enfin, en décembre de la même année, MACHT (113) fait paraître des travaux similaires sur le sérum des lépreux.

CONCLUSIONS

L'exposé que nous venons de faire ne prétend pas rassembler tous les travaux se rapportant à la phytopharmacologie. Il nous montre cependant que, si beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de substances très diverses sur l'évolution des végétaux, seuls quelques chercheurs ont eu l'idée d'inverser le problème et d'utiliser un test végétal pour mettre en évidence la présence d'un principe toxique dans un mélange quelconque. Les travaux de la plupart des auteurs permettaient cependant de prévoir que la solution d'un tel problème était possible. Ils avaient montré, en effet, que la plante réagit nettement et régulièrement à l'absorption de certaines substances et constitue ainsi un réactif vivant parfois extrêmement sensible. Le fait qu'il est impossible d'obtenir une culture normale de *Sterigmatocystis niger* dans un vase en argent, les expériences de G. BOHN et A. DRZEWINA sur l'action stimulante exercée par l'argent métallique sur la germination des graines de cresson alénois; les essais de MACHT et de ses

collaborateurs sur la toxicité du benzoate de sodium viennent à l'appui de cette manière de voir.

Sans doute le réactif végétal ne se comporte pas toujours comme les animaux ou les fragments d'organes utilisés dans les essais pharmacologiques, il n'en reste pas moins vrai que les travaux de phytopharmacologie, en nous permettant d'opérer sur la cellule vivante, doivent nous conduire à des résultats souvent intéressants. En particulier, le fait que la cellule végétale paraît extrêmement sensible à l'action de certains composés résultant de la décomposition de la cocaïne, doit nous permettre d'utiliser des végétaux pour suivre les altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne sous l'influence du chauffage ou de la conservation. L'emploi d'un réactif végétal présente même quelques avantages sur l'utilisation des animaux, pour des mesures physiologiques. Il est, en effet, facile et peu coûteux de se procurer des plantes, il sera donc possible de faire un grand nombre d'essais et d'obtenir, par suite, des moyennes plus exactes. Enfin, les essais comparatifs seront simplifiés par le fait que les graines d'un même lot présentent certainement des variations individuelles moins accusées que les animaux communément employés dans les laboratoires.

Nous avons au cours de cet exposé rapporté les principales techniques employées par les auteurs dans leurs essais concernant l'influence de certains composés sur le développement des végétaux.

Certains auteurs utilisent des organes isolés : MARCASSI trempe des feuilles vertes dans un liquide actif et note le temps que ces feuilles mettent à jaunir; MAQUENNE et DEMOUSSY utilisent à peu près le même procédé; O. V. HYKES emploie des branches coupées de peuplier ou de cerisier. On peut leur faire le même reproche que MACHT adressait déjà à SCHIK qui utilisait des fleurs coupées : « ces conditions ne sont pas éloignées de celles que rencontrerait un physiologiste qui poursuivrait des recherches pharmacologiques sur un animal décapité, sans prendre les précautions nécessaires pour maintenir une respiration artificielle. »

D'autres auteurs : P. O. REVEIL, CH. CORNEVIN, KANDA, CH. RICHER sèment directement dans le sol des graines qu'ils arrosent ensuite avec le principe actif. Il paraît difficile de préjuger des réactions qui peuvent naître entre les composants du sol et la substance active et des répercussions qu'elles peuvent avoir sur la croissance de la plante.

Pour éviter cette objection la plupart des auteurs font germer et cultivent leurs graines en présence seulement du liquide actif. L. LUTZ sème ses graines sur du sable lavé arrosé avec les solutions à étudier; J. MOREL, U. MOSSO, TH. BOKORNY, G. BOHN et d'autres encore font germer leurs graines sur du papier-filtre imprégné de la solution à étudier; W. SIGMUND se contente de faire tremper ses graines dans la solution active, puis cette dernière est remplacée par de l'eau distillée; enfin HIBBARD et H. COUPIN font germer des graines dans l'eau distillée et ils les portent ensuite dans le liquide actif. La méthode de KRUTICKJ,

très ingénieuse, ajoute cependant un traumatisme à l'action pharmacologique.

Beaucoup de ces auteurs ne font aucune mesure et se contentent de noter au bout de combien de temps survient la mort des plantes. Ces méthodes sont trop lentes pour pouvoir être utilisées dans nos essais et, d'autre part il paraît difficile de séparer la toxicité de l'inanition quand les plantes en expérience ne s'étiolent qu'après 10 ou 20 jours de culture.

Quelques auteurs ont ajouté à leur solution toxique des substances assimilables: VAN LAER cultive des embryons d'orge sur du sable imprégné d'une solution de phosphate acide de potassium et de saccharose. COGGESHALL, SHIVE, MACHT utilisent la solution de SHIVE comme liquide nutritif. La technique de COGGESHALL qui comporte deux temps successifs est un peu trop compliquée pour nos premiers essais. Nous avons préféré employer la méthode de D. I. MACHT, après l'avoir légèrement modifiée. Cette méthode est simple, rapide et les essais de l'auteur effectués déjà avec le chlorhydrate de cocaïne, permettaient d'en espérer de bons résultats; nous avons donc repris les essais de MACHT, mais en les appliquant à l'étude des altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne sous l'action de la chaleur et de la conservation. Rappelons que cet auteur avait simplement envisagé l'influence du chlorhydrate de cocaïne pur et de ses produits de dédoublement: benzoylecgonine, ecgonine, benzoate de méthyle, alcool méthylique et acide benzoïque (ou plus exactement benzoate de sodium) sur la croissance du lupin.

Nous avons vu au cours de cette étude que différents auteurs, en étudiant le même produit, obtiennent parfois des résultats discordants. Ces divergences paraissent souvent attribuables à des différences de techniques; nous croyons donc utile, avant de passer à l'exposé de nos résultats, de préciser notre technique dans tous ses détails mêmes les plus minimes.

CHAPITRE II

TECHNIQUE UTILISÉE DANS NOS ESSAIS

Dans ce deuxième chapitre nous nous sommes efforcés de donner des détails très précis sur la méthode utilisée au cours de ces recherches.

Après avoir réuni les détails techniques publiés par D. I. MACHT et exposé les essais que nous avons été amenés à faire pour nous familiariser avec la méthode de cet auteur, nous décrivons le matériel utilisé et nous précisons les modifications que nous avons été amenés à apporter à la technique originale de MACHT.

Enfin nous avons complété ces détails, d'ordre technique, par un exposé de nos essais sur l'influence de la réaction sur la croissance du lupin blanc.

EXPOSÉ DE LA TECHNIQUE DE D. I. MACHT

Il semble bien que D. I. MACHT et ses collaborateurs aient modifié ou précisé leur technique au fur et à mesure que des essais plus nombreux leur en montraient l'utilité; nous en avons tenu compte, et, pour avoir une juste idée de cette méthode nous avons dû en rechercher les éléments dans plusieurs publications, puisque souvent, dans un nouvel article, les auteurs donnaient des précisions encore inédites ou corrigeaient certains détails. Nous n'avons rapporté, dans notre bibliographie, qu'un bref

aperçu de cette méthode; nous en donnons ici une analyse aussi complète que possible, tirée de quatre publications de D. I. MACHT parues en 1922 (107), en 1924 (108), en 1928 (114) et en 1929 (115).

D. I. MACHT a choisi le lupin blanc, *Lupinus albus*, parce que cette plante germe facilement et que sa racine unique et droite est facile à mesurer. Les graines utilisées ne doivent pas être vieilles, ni véreuses. Elles sont mises à tremper toute une nuit dans de l'eau de conduite où elles gonflent.

Ainsi gonflées, les graines sont plantées sur un fond de germination convenable; le plus favorable est le fond de sphagnes finement broyées : « il est de la plus grande importance que cette « mousse soit suffisamment humide. Si elle est trop humide, les « germes vont pourrir, si, au contraire, la mousse est sèche, les « jeunes pousses vont croître en mauvaises conditions et souffrir de la sécheresse. Les expériences entreprises dans ces conditions ont montré que cette mousse doit contenir à peu près « 75 à 80 % de son poids d'eau. ». La mousse doit être lavée et rincée plusieurs fois avec de l'eau chaude pour enlever les substances acides qui peuvent nuire à la croissance. Les graines sont plantées dans la mousse le hile en bas.

En 1922 et en 1924, MACHT fait germer les graines à l'obscurité et à l'étuve à 20°; en 1929, la germination a lieu dans l'obscurité et à la température de la chambre.

La durée de la germination est de 2 à 3 jours, c'est le temps nécessaire pour que les racines atteignent de 20 à 35 m/m. La longueur des jeunes pousses est, à ce moment, exactement mesurée; MACHT ne donne aucun détail sur cette opération et ne fixe aucun repère.

Les graines sont ensuite placées sur les bords de tubes à essais contenant les solutions à examiner, de façon que, seules, les racines trempent dans le liquide. Les solutions à étudier sont obtenues à partir de la solution nutritive de SHIVE, dont la composition est donnée par MACHT de la façon suivante :

10,40 cc. d'une solution M/2 de nitrate de calcium.

30 cc. d'une solution M/2 de sulfate de magnésium.

36 cc. d'une solution M/2 de phosphate monopotassique.

Eau distillée q. s. p. 1.000 cm³.

A vrai dire, MACHT ne précise qu'une seule fois, en 1922, la nature de ce phosphate. Par la suite, il écrit simplement : « 36 cc. d'une solution de phosphate », sans indiquer la nature de la base. Cette solution est diluée au demi avec de l'eau distillée, dans les tubes de la série témoin. Le pH de cette solution serait, selon MACHT, égal à 6,40. D. I. MACHT s'est, d'ailleurs, très peu intéressé à la question de l'influence de la réaction sur la croissance des jeunes racines du lupin. Il a fait, dit-il, divers essais de culture entre PH 4,40 et PH 7,20, sans trouver des variations sensibles.

Dans les tubes des séries d'études, la solution nutritive est diluée au demi avec les solutions actives. Les tubes à essais ainsi préparés sont portés dans une étuve maintenue à la température de 20°; MACHT insiste sur le choix de cette température;

c'est ainsi qu'après avoir, en 1922, écrit: « Il est préférable de prendre 20°, mais ce n'est pas absolument nécessaire, puisque toutes les plantes sont exactement dans les mêmes conditions et que toute variation de température affecte à la fois toutes les graines »; il devient plus strict en 1929: « Il est très important que la croissance se fasse à une température de 20°; plus haute, elle serait peut-être tellement accélérée, que des différences plus petites entre les séries pourraient disparaître. On peut observer une action analogue dans la saison chaude. Il est un fait biologique bien connu que, sans aucune considération de température, les processus biologiques se montrent habituellement au printemps et au début de l'été plus puissants et plus intenses. A ce moment, il faut employer des températures de 18° à 20°; plus haut, la croissance rapide des plantes masquerait les facteurs d'inhibition. »

« L'obscurité, prend-il soin de préciser, est nécessaire; il faut insister sur ce fait que la croissance doit se faire à l'obscurité. » Enfin, des résultats plus précis sont obtenus si l'on choisit des pousses de même longueur, et surtout de même espèce.

Après vingt-quatre heures de culture dans ces conditions, les pousses sont à nouveau mesurées. Ces mesures avant et après culture, permettent d'établir des moyennes d'accroissement dans la série témoin et dans les séries d'études. Chaque série comprend de 5 à 10 graines. L'accroissement moyen de chaque série d'étude est comparé à l'accroissement moyen de la série étalon et rapporté à 100. Ce rapport est appelé par MACHT « coefficient de poussée ». Les pourcentages obtenus sont réunis dans des tableaux qui résument, en fonction des concentrations employées, l'action de chacun des produits essayés.

EXAMEN DE LA MÉTHODE DE MACHT ESSAIS PERSONNELS

Le matériel

Avant d'étudier systématiquement l'influence des solutions de chlorhydrate de cocaïne sur la croissance du lupin, nous avons étudié longuement les différents points de la technique de MACHT, afin de pouvoir en préciser tous les détails. Nos premiers essais ont ainsi porté, d'une part, sur le matériel à utiliser (choix des graines, de la solution nutritive, des étuves); d'autre part, sur les différents temps de la germination (humectation préalable,

germination proprement dite et mise en culture). Nous avons ensuite cherché à exprimer d'une façon simple à l'aide de tableaux et de graphiques les résultats obtenus; nous avons, enfin, noté les modifications morphologiques et anatomiques survenues pendant la croissance des plantes intoxiquées. Il est à remarquer que ce dernier point n'avait pas été abordé par MACHT et ses collaborateurs.

LES GRAINES

Les graines de lupin que nous avons utilisées au cours de ce travail étaient des graines de lupin blanc, *Lupinus albus*. Elles nous avaient été procurées par la maison Vilmorin-Andrieux, à Paris, et provenaient d'un même lot. Notre fournisseur nous a garanti qu'elles étaient de la dernière récolte. Ces graines ont



Fig. 1
Graine de Lupin
grandeur naturelle

la forme de petites masses aplaties, de contour plutôt rectangulaire; elles sont généralement biconcaves, une légère dépression marque le centre, tandis que la graine est plus épaisse sur les bords. Elles mesurent environ 8 à 12 m/m. selon leur plus grande dimensions sur 6 à 8 m/m. de large; leur épaisseur atteint sur les bords 5 m/m., mais elle n'est que de 3 à 4 m/m. au centre. Leur couleur est jaune clair et leur aspect est mat. Le hile est parfaitement visible.

LES ÉTUVES

Nous avions à notre disposition deux étuves électriques. L'une servait à assurer la température favorable à la germination des graines. L'autre était réservée à la culture des jeunes racines dans les solutions à étudier.

Cette dernière étuve était une étuve courante pour bactériologie chauffée par une résistance et réglée par un régulateur bi-métallique. Nous avons craint de détériorer rapidement une étuve semblable en l'utilisant pour faire germer nos graines. Comme nous le verrons tout à l'heure, les graines gonflées sont placées sur des plateaux garnis de mousse imprégnée d'eau; une très grande humidité règne de ce fait à l'intérieur de l'appareil; le régulateur et la résistance pourraient en souffrir. Nous avons été conduit à utiliser une étuve chauffée par des lampes à filaments de carbone et réglée par un régulateur à mercure.

Le régulateur était constitué par un tube à essai horizontal rempli de mercure et fermé par un bouchon en caoutchouc percé de deux trous par lesquels passaient deux tubes capillaires en verre. La masse du mercure était reliée au circuit par un fil de cuivre qui passait par l'un de ces tubes et lui était soudé à son extrémité par fusion du verre. Le second tube capillaire recourbé en U était ouvert à ses deux extrémités. Une colonne de mercure

formée par un léger excès du mercure placé dans le tube à essai oscillait à l'intérieur de ce tube capillaire suivant les variations de température. Un fil d'argent relié à l'autre borne du circuit était introduit à l'intérieur de ce tube, de telle façon qu'à une température inférieure à 20°, la colonne de mercure descendait, le contact était rompu et le circuit ouvert. Une très faible variation de température provoquait un important déplacement de la colonne grâce au faible diamètre du tube capillaire et à l'importance de la masse de mercure du réservoir.

Le système de chauffage comportait deux résistances : l'une placée à l'intérieur de l'étuve, était composée de 2 à 5 lampes à filaments de carbone; l'autre, placée à l'extérieur, était constituée par une résistance un peu supérieure à la somme des résistances internes. Ces deux résistances étaient en série; le régulateur était en parallèle sur la résistance interne. Lorsque la température de l'étuve était supérieure à 20°, un circuit, composé de la résistance externe et du régulateur, était fermé; aucun courant ne passait dans la résistance interne. La résistance externe était, en effet, capable de rester sous tension sans consommation exagérée. Lorsque la température descendait au-dessous de 20°, le contact mercure-argent se rompait, le courant passait dans les deux résistances interne et externe et l'étuve était reheaufiée.

Si ce système consommait une quantité assez importante d'électricité il avait l'avantage, tout en maintenant une température assez constante à l'intérieur de l'étuve, de ne pas risquer d'être détérioré dans une atmosphère saturée d'humidité.

LA SOLUTION NUTRITIVE

L'emploi d'une solution nutritive est-il nécessaire ou seulement utile à l'allongement de la racine? En effet, tandis que MACHT utilise la solution de SHIVE, certains auteurs, comme nous l'avons vu, conduisent leurs essais en employant uniquement de l'eau distillée.

Nous avons fait quelques essais comparatifs; des graines de lupin germées étaient cultivées dans la solution de SHIVE, d'autres trempaient simplement dans l'eau distillée; deux autres séries de graines étaient cultivées en présence de chlorhydrate de cocaïne, l'une dans l'eau distillée, l'autre dans la solution de SHIVE. Exceptionnellement la durée de cette épreuve était portée à quatre jours.

Le premier jour, il n'y avait aucune différence entre les séries dans l'eau distillée et les séries dans la solution de SHIVE; les pourcentages de croissance des deux séries de graines cultivées dans les solutions de cocaïne étaient presque identiques.

Dès la fin du deuxième jour, il n'en était plus de même. Les jeunes racines qui cultivaient dans la solution nutritive étaient sensiblement plus développées que les autres; ces différences s'accroissaient très nettement le troisième et le quatrième jour. Après quatre jours de culture, la longueur moyenne des témoins dans

l'eau distillée n'atteignait que 77 mm. contre 120 mm. dans la solution nutritive. Le coefficient de croissance qui était de 87 % dans les solutions de cocaïne à 1 %, en présence des sels de SHIVE, après quarante-huit heures de culture, n'était que de 70 % dans les solutions de cocaïne, de même titre mais privées de sels nutritifs. En prolongeant la durée de l'épreuve, nous avons constaté que la croissance était uniformément ralentie dans toutes les séries en eau distillée : l'accroissement moyen, le quatrième jour n'était plus que de 4,4 mm. dans la série en eau distillée et de 4 mm. dans la solution de cocaïne à 0,01 % ; il était égal à 21 mm. dans la série témoin et à 19 mm. dans la solution de cocaïne à 0,01 % additionnée de liquide de SHIVE.

La croissance des jeunes racines dans l'eau pure est retardée par une sorte de carence minérale; il devient presque impossible de séparer dans certains cas la toxicité de la carence et les résultats des recherches entreprises peuvent être faussés. Il nous a donc paru utile de fournir à la plante certaines substances minérales indispensables à sa croissance normale.

Un gros avantage de la solution de SHIVE réside dans la simplicité de sa formule, elle introduit peu d'éléments nouveaux dans le milieu de culture; en outre, et nous verrons plus loin l'importance de ce facteur, cette solution présente un pH voisin du pH optimum de culture des jeunes racines de lupin et possède un pouvoir tampon appréciable.

Selon MACHT, le pH des solutions témoins, préparées en mélangeant à un volume de solution de SHIVE un volume d'eau distillée, serait égal à 6,40. De notre côté, nous n'avons jamais trouvé pour cette même solution que des valeurs de pH comprises entre 4,40 et 4,60. Pour expliquer cette contradiction nous avons été amenés à faire diverses suppositions.

Nous avons dit comment dans quatre publications MACHT donne la composition de la solution de SHIVE : une seule fois, la nature du phosphate est indiquée clairement; ailleurs il est écrit simplement « 0 mol. 5 de phosphate ». Nous avons donc préparé des solutions dans lesquelles nous avons remplacé le phosphate monopotassique par d'autres phosphates alcalins et nous avons mesuré les pH des solutions obtenues. Nous avons ainsi trouvé avec le phosphate bipotassique un pH de 7,80 (solution trouble); avec le phosphate monosodique un pH de 4,50; et avec le phosphate disodique un pH de 7,80 (solution trouble). Aucune de ces expériences n'a confirmé le chiffre fourni par MACHT.

D'autre part, nous avons pu nous reporter à une publication de JOHNES et SHIVE (68); ces auteurs étudient l'influence de la culture des jeunes racines de lupin sur le pH final de divers milieux de culture. Ils utilisent pour cela divers milieux et en particulier la solution de SHIVE, pour laquelle ils indiquent un pH initial de 4,50.

Ainsi nous en arrivons à supposer une erreur typographique dans la publication de MACHT et à lire pH 4,60 au lieu de pH 6,40.

La technique

Certains points de la méthode, décrite par MACHT, sont assez obscurs ou demandent à être précisés. Nous avons étudié les différents temps de cette méthode, en nous livrant, en quelque sorte, à un travail de mise au point personnelle, qui devait nous donner l'expérience dont nous avions besoin et qui nous a amené à adopter certaines modifications. Cette technique peut se diviser en quatre opérations : l'humectation, la germination, la culture et l'expression des résultats.

HYDRATATION

Les graines sèches étaient mises à tremper dans un cristallin de verre soigneusement lavé. Ce cristallin était rempli aux trois quarts d'eau de conduite ordinaire de la ville de Paris : eau dite de source propre à la consommation. Les graines, complètement immergées, séjournaient quinze à vingt heures à l'obscurité et à la température de la salle, c'est-à-dire entre 10 et 15° l'hiver et 15 à 26° l'été. Après ce séjour dans l'eau de conduite, les graines étaient gonflées et leur dépression centrale avait disparu; elles présentaient alors une forme bi-convexe et elles atteignaient de 12 à 17 mm. de long sur 15 mm. de large et près de 7 à 8 mm. en épaisseur. Elles étaient devenues brillantes, leur couleur jaune était avivée et leur surface présentait des veines foncées bien visibles.



Fig. 2
Aspect
d'une graine
de Lupin après
hydratation

GERMINATION

Nous aurons à envisager successivement le fond de germination, la durée, la température, la question de la lumière ou de l'obscurité et enfin l'aspect des graines germées.

Fond de germination :

Il faut convenir avec MACHT, que le fond de germination le plus favorable est bien constitué par les sphaignes. Ces mousses se prêtent, beaucoup mieux que le coton hydrophile, au but désiré. Nous avons, en effet, tenté d'utiliser le coton hydrophile; il nous paraissait alors que le coton, soigneusement préparé, pouvait être un fond de germination absolument inerte et plus facile à laver

que la mousse. Des difficultés imprévues l'ont fait abandonner, à la suite des essais suivants : 10 g. de coton hydrophile étaient lavés soigneusement avec de l'eau distillée (un litre en quatre reprises). Ce coton était essoré jusqu'à ce qu'il ne contienne plus que cinq fois son poids d'eau distillée. Il était alors étalé sur une gaze hydrophile, lavée au préalable, et tendue sur un cristalliseur contenant de l'eau distillée; le niveau de l'eau n'arrivait qu'à 4 cm. au-dessous de la gaze. Des graines simplement réparties sur ce coton humide et laissées quarante-huit heures à 20° avaient très bien germé; les jeunes pousses étaient même très vigoureuses, mais elles n'étaient pas droites, n'ayant pu se frayer un chemin facilement à travers le coton. La plupart étaient si irrégulières qu'il était presque impossible de les mesurer exactement; cette difficulté nous fit abandonner ce mode de germination.

Les jeunes racines se frayent au contraire très facilement un passage à travers la mousse et se développent bien droites; il est alors facile de les mesurer convenablement. Les sphaignes constituent d'ailleurs un milieu presque inerte : ayant fait bouillir 100 gr. de mousses dans quatre litres d'eau distillée nous avons titré l'acidité des eaux de coction, cette acidité, en acide chlorhydrique, ne dépasse pas 0,011 gr. par litre, de sorte qu'en lavant soigneusement ces mousses on peut être assuré de leur neutralité pour les jeunes racines.

Dans ce but, nous avons toujours opéré de la façon suivante : 100 gr. de mousses finement broyées trempant dans 4 litres d'eau distillée étaient maintenus à l'ébullition pendant une demi-heure. Après refroidissement, la mousse était essorée une première fois; puis mise à macérer à nouveau dans 4 litres d'eau distillée et soigneusement agitée dans cette eau; elle était à nouveau essorée et ce lavage était répété deux fois encore. La mousse était alors prête pour l'usage. Les mêmes sphaignes peuvent évidemment servir plusieurs fois; il est suffisant de les malaxer à nouveau à plusieurs reprises dans l'eau distillée chaude sans qu'il soit toutefois nécessaire de renouveler la coction. Cependant il est bon d'utiliser de nouvelles sphaignes après six ou sept épreuves par mesure de précaution pour éviter les moisissures. Il est important d'ameublir la mousse qui a été exprimée après lavage, de façon à obtenir un fond de germination convenable.

Ce fond de germination doit être humide. MACHT utilise un fond de germination qui ne contient, dit-il, que 75 à 80 % de son poids d'eau distillée, mais il ne précise pas s'il s'agit de mousses sèches ou fraîches. En réalité des sphaignes sèches imprégnées de 75 % de leur poids d'eau sont très peu humides. Il est nécessaire de les exprimer à la presse pour atteindre ce taux d'humidité. Des essais de germinations ont été faits sur des mousses sèches additionnées de 100, 500, 1.000 % d'eau distillée. Le taux de 500 % s'est montré le plus favorable. Dans ce cas les jeunes pousses s'étaient très bien développées et la croissance avait été surtout très régulière, c'est-à-dire que les écarts entre les longueurs des différentes racines étaient beaucoup plus faibles que dans les autres séries.

D. I. MACHT ne précise pas comment il dispose son fond de

sphaignes. Nous avons d'abord étalé la mousse sur une gaze hydrophile, tendue sur un cristalliseur rempli à moitié d'eau. Cette eau, selon nous, devait atténuer la dessiccation du milieu de culture pendant son séjour à l'étuve. En réalité, il est difficile d'obtenir dans ces conditions une couche de mousse uniforme et suffisamment épaisse pour éviter que l'extrémité des jeunes racines n'atteigne ou même ne traverse la gaze. Or il est évident, que de telles racines ne peuvent pas convenir à des expériences précises. D'autre part, l'évaporation était très faible, et la mousse ne se desséchait pas sensiblement pendant son séjour à l'étuve; nous avons donc utilisé de grands plateaux émaillés, à bords relevés, dans lesquels nous pouvions répartir la mousse, sur une épaisseur de 5 à 6 centimètres. Jamais, dans ces conditions, les jeunes racines n'atteignaient cette longueur au bout de quarante-huit heures de culture; on ne risquait pas de les voir s'altérer ou, tout au moins, se recourber en arrivant au contact du fond du plateau. De plus, une couche de cette épaisseur conservait bien son humidité et, seule la surface se desséchait légèrement, sans dommage pour les pousses. Les plateaux mesuraient environ 35 cm. en longueur sur 15 cm. en largeur, il nous était facile de placer sur cette surface un très grand nombre de graines. Il est, en effet, utile de pouvoir disposer, au début d'un essai, d'un grand nombre de jeunes sujets, parmi lesquels on ne retiendra que les plus favorables, comme nous le verrons tout à l'heure. Les graines gonflées étaient plantées à plat et non pas le hile en bas comme MACHT l'indique. La position à plat oblige la jeune racine à prendre une direction perpendiculaire au plan général de la graine, ce qui facilite ensuite la disposition de celle-ci sur les bords des tubes de culture.

Durée

La durée de la germination peut être normalement fixée à deux jours et demi. C'est en effet le temps nécessaire pour que les germes atteignent de 20 à 35 mm. Si la germination dure plus longtemps les germes sont évidemment plus longs et plus résistants, la sensibilité du réactif en sera diminuée d'autant.

Température

Il est préférable, comme l'a indiqué MACHT, que la germination ait lieu à 20°; à une température inférieure la germination est lente, les germes n'ont pas bel aspect, leur accroissement est ensuite très faible dans la solution de SHIVE. Le contraire se produit si la température est plus élevée; les germes sont trop grands pour se prêter à un bon usage.

Les influences saisonnières se traduisent, d'après MACHT, par une accélération de la croissance se produisant au printemps et au début de l'été, indépendamment de toute variation de température. A Paris, jusqu'à la fin du mois de juin, nous n'avons pas retrouvé, dans nos essais, cette action favorisante. Ce n'est qu'à partir de ce moment, dans une période où la température ambiante atteignait de 24 à 28°, que nous avons perçu nettement

une accélération, qui paraissait plus due à la chaleur, qu'à une stimulation saisonnière. Durant les chaudes journées du mois d'août, nous avons installé, dans notre étuve, un système réfrigérant qui maintenait la température à 20° et la germination est redevenue presque normale. Il n'en a pas été de même quand est apparu l'automne, malgré les précautions que nous avons prises pour maintenir la température à 20° dans l'étuve durant le mois d'octobre, la germination était devenue plus lente; les germes n'atteignaient 20 à 30 mm. qu'après trois jours pleins.

Obscurité

Les graines se développaient aussi bien dans notre étuve à lampes à filaments de charbon, que dans l'étuve à résistance. Quand D. I. MACHT indique que l'obscurité est nécessaire, il pense sans doute l'opposer à la lumière du jour ou à une lumière intense, et c'est probablement l'établissement de la fonction chlorophyllienne qu'il entend éviter ainsi.

Aspect des graines germées

Les germes apparaissent après dix à douze heures d'étuve. La jeune pousse ne mesure que 8 à 10 mm. après vingt-quatre heures; elle a la forme d'un cône allongé; son diamètre décroît très régulièrement du collet à la coiffe. Lorsque les jeunes racines atteignent de 18 à 35 mm. elles sont retirées de la mousse. La graine a perdu un peu de son humidité, le tégument est redevenu mat et reste très adhérent. Sur la jeune pousse, le collet est marqué par un sillon blanc parfaitement visible; au-dessus du collet, l'hypocotyle, qui peut mesurer de 10 à 12 mm., est cylindrique et de couleur blanc crèmeux. En dessous, la jeune racine est légèrement jaune et son diamètre décroît jusqu'à la coiffe.



Fig. 3
Aspect d'une graine
de Lupin à la fin de
la période de « germination »

CULTURE

Mesure des jeunes racines

Quand la germination est terminée, il importe de mesurer les germes; mais MACHT n'indique pas comment il procède à cette opération. On ne peut pas utiliser comme point de repère un point de la graine, par exemple, l'endroit où la jeune racine sort de la graine; au cours des quarante-huit heures de culture dans la solution SHIVE la graine s'ouvre plus ou moins, elle est souvent déjetée, l'hypocotyle se recourbe très souvent; toutes choses qui risquent de fausser les résultats. Nous avons choisi un repère fixe : la dépression située au niveau du collet, elle est suffisamment visible sur toutes les pousses pour qu'on puisse facilement l'uti-

liser. Il nous paraît utile de rapporter ici quelques détails sur notre façon d'opérer. Les graines sont mesurées plateau par plateau, afin d'éviter qu'elles ne se dessèchent pendant l'opération. Elles sont triées avec soin et toutes les jeunes racines d'aspect chétif ou seulement irrégulier sont rejetées, de sorte que, sur environ 100 graines que pouvait contenir un plateau, 60 à 70 seulement étaient retenues, on avait surtout soin d'éliminer les cônes courts. Les jeunes racines, mesurées à l'aide d'un double décimètre très propre, étaient classées suivant leur longueur et placées dans les solutions à étudier dès que tout le contenu d'un plateau avait été examiné. Chaque série d'essai comportait 10 tubes numérotés de 1 à 10 et on disposait dans tous les tubes de chaque série, portant le même numéro, des racines de même longueur ou de longueurs très voisines. Les séries étaient ainsi exactement comparables et les moyennes des longueurs des jeunes racines dans les diverses séries étaient très voisines les unes des autres.

Préparation des solutions

Les solutions à étudier sont réparties dans des tubes à essai. Les tubes à essai utilisés, en verre blanc ordinaire, étaient de différents modèles : tubes droits de 8 cm. de hauteur et 9 mm. de diamètre, d'une contenance de 8 cc. environ ; tubes droits de 16 cm. de hauteur et 12 mm. de diamètre, d'une contenance de 18 à 20 cc. ; tubes coniques de 13 cm. de hauteur et 12 mm. de diamètre, d'une contenance ne dépassant pas 14 cc. Les plus petits étaient employés pour des solutions concentrées des produits rares ou coûteux. Ces tubes étaient placés dans des porte-tubes et remplis à l'aide des solutions à étudier de façon qu'ils soient prêts au moment où l'on effectue la mesure. La graine doit reposer sur les bords du tube, seule la jeune racine baigne dans le liquide qui ne fait qu'effleurer la graine. Celle-ci est parfaitement en équilibre si, comme nous l'avons déjà dit, on a pris la précaution de la planter à plat sur la mousse. Nous avons vérifié que la graine se développe mieux dans cette position que lorsqu'on la dépose sur des flotteurs en liège ou en paraffine, placés à la surface des liquides à étudier. Enfin, une graine complètement immergée périt rapidement asphyxiée.

Une première série de dix tubes constitue la série témoin : la solution est préparée en mélangeant un volume de solution de SHIVE à un volume d'eau distillée. La solution de SHIVE est préparée en mélangeant 10 cc., 40 d'une solution M/2 de nitrate de calcium à 118 grammes pour 1.000 ; 30 cc. d'une solution de sulfate de



Fig. 4
Position
de la plantule
pendant la période
de « culture »

magnésium M/2 à 123 grammes pour 1.000; et 36 cc. d'une solution de phosphate acide de potassium M 2 à 68,50 grammes pour 1.000 et en complétant à 1.000 avec de l'eau distillée. Les solutions à étudier sont additionnées d'un volume égal de solution de SHIVE. Les titres de ces solutions indiquent toujours dans ce travail, la concentration des solutions ainsi diluées au demi. Quand nous parlerons, par exemple, d'une solution à 1 % de chlorhydrate de cocaïne, il s'agira toujours d'une solution à 2 % dans l'eau distillée, additionnée de son volume de solution de SHIVE et dont le titre sera ainsi devenu 1 %.

Température

Les jeunes pousses placées sur les tubes sont portées immédiatement à l'étuve; la température de l'étuve sera, comme dans le cas de la germination, de 20°. Tout ce que nous avons dit à ce sujet à propos de la germination pourrait être répété à propos de la culture. Les mêmes influences saisonnières continuent à se faire sentir. A une température inférieure, la croissance est ralentie, les accroissements sont faibles et, si pour chaque mesure l'erreur absolue reste la même, l'erreur relative devient plus importante; les petites différences qui peuvent exister entre diverses séries sont alors plus difficiles à saisir. Quand la température est supérieure à 20°, la croissance est trop rapide et, comme MACHT, nous pensons que la sensibilité du test est diminuée.

Durée

La technique originale de MACHT ne tient compte que de l'allongement des racines survenu pendant les premières vingt-quatre heures de culture en solution de SHIVE diluée. L'essai est terminé au bout de cette première journée. Il nous a paru qu'on avait toujours avantage à prolonger l'essai de vingt-quatre heures et à comparer l'accroissement des différentes séries pendant la première et la deuxième journée de la culture. La méthode ainsi modifiée nécessite trois mesures successives des jeunes racines, d'une part au moment de la mise en culture, et d'autre part après vingt-quatre et quarante-huit heures de séjour à l'étuve. En opérant avec précaution, le développement de la jeune plante ne paraît pas ralenti par ces manipulations successives.

En utilisant cette nouvelle technique, on constate que, par exemple, tandis qu'une solution de chlorhydrate de cocaïne à 2 % empêche tout allongement des racines de lupin, une solution à 1,25 % permet encore un accroissement sensible le premier jour de la culture et ne devient inhibitrice qu'au cours des deuxièmes 24 heures de culture. A côté de la dose toxique minima de MACHT, représentée par la plus faible concentration qui « tue » les racines en 24 heures, nous sommes amenés à considérer une nouvelle dose toxique, inférieure à la première, que nous désignerons par le nom de « dose critique » et qui sera représentée par la plus faible concentration permettant une croissance appréciable des racines pendant la première journée de la culture.

mais empêchant tout accroissement à partir du deuxième jour de l'épreuve.

Inversement, on observe parfois que l'accroissement de racines intoxiquées, assez faible le premier jour de la culture, se rapproche de celui des témoins pendant les 24 heures suivantes. Ce fait, qui se produit généralement avec des solutions diluées de produits toxiques, ne doit pas seulement correspondre à un état de plus grande résistance présenté par des pousses plus âgées, mais doit aussi être en rapport avec la destruction ou l'insolubilisation du toxique par la plante.

Obscurité et évaporation

La culture a toujours eu lieu à l'obscurité. Nous n'avons pas cherché à reprendre les essais effectués par quelques auteurs avec des alcaloïdes et à comparer la croissance à la lumière et à l'obscurité. Nous ne nous sommes pas davantage préoccupés de l'évaporation; celle-ci était très faible par suite de la température peu élevée et de la surface d'évaporation très réduite. Il était alors inutile de remplacer la petite quantité d'eau évaporée.

Aspects des jeunes plantes à la fin de l'épreuve

Lorsque les graines ont séjourné 24 heures à l'étuve dans les conditions que nous avons indiquées le tégument commence à se fendre et laisse voir une partie des cotylédons colorés en jaune vif. Après 48 heures de culture, le tégument fendu est prêt à tomber, les cotylédons apparaissent à nu d'un beau jeune mat. L'hypocotyle est blanc et peut atteindre 20 mm. de longueur, son diamètre mesure entre 4 à 5 mm., le collet reste parfaitement visible. La jeune racine est de teinte nettement jaunâtre, mais l'extrémité est de teinte plutôt crème. Elle est très mince vers la coiffe où son diamètre n'est plus guère que de 1 mm. Les poils absorbants sont visibles au microscope, mais les radicelles ne sont pas encore apparues. La longueur de la racine, du collet à la coiffe, atteint chez les témoins 60 à 70 mm.



Fig. 5
Aspect d'une jeune
plantule à la fin de la
période de « culture »

EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les pourcentages de croissance

Nous avons indiqué comment une première mesure des jeunes racines est faite immédiatement avant la mise en culture. Une seconde mesure, dans les mêmes conditions, a lieu à la fin

TABEAU I
SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE CHAUFFÉES PENDANT 5 HEURES A 120°

Concentra- tions des milieux de culture	Heures des mesures	LONGUEURS DES 10 RACINES (en mm.)										Longueurs moyennes		Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			valeur absolue	pourcen- tages	valeur absolue	pourcen- tages	valeur absolue	pourcen- tages
0,125 %																			
	0 h.	28	25	26	23	21	21	24	22	20	30	24,00							
	24 h.	32	27	25	24	23	25	27	27	25	30	26,50	13,80	2,50	0	0	2,50	6,23	
	48 h.	32	26	25	24	23	24	27	26	27	29	26,30							
0,025 %																			
	0 h.	28	26	25	23	22	23	25	23	20	34	24,90							
	24 h.	34	30	34	30	21	29	36	32	28	43	31,70	37,77	6,80	11,50	52,00	18,30	45,60	
	48 h.	38	38	39	45	39	55	45	38	52		43,20							
témoin																			
	0 h.	28	27	25	22	22	22	23	23	20	34	24,60							
	24 h.	38	44	46	37	39	42	41	48	38	53	42,60	100	18	22,10	100	40,10	100	
	48 h.	52	69	65	58	60	70	63	78	61	71	64,70							

de la première journée de culture et une dernière mesure termine l'épreuve à la fin de la deuxième journée.

La série témoin, comme les autres séries, comporte 10 graines. Chaque épreuve réunit de 10 à 15 séries de 10 graines. Les différentes longueurs des 10 jeunes racines d'une série sont additionnées après chaque mesure; le total, divisé par 10, donne la longueur moyenne. Quelquefois, au cours de la première ou de la seconde mesure, nous avons dû éliminer une ou exceptionnellement plusieurs graines : il arrivait, en effet, que certaines de celles-ci, pour des raisons mal définies, que l'on peut, peut-être, attribuer à un traumatisme accidentel, présentaient de telles différences d'accroissement avec leurs voisines que nous avons jugé bon de les éliminer. Il est bien entendu que, dans ce cas, la longueur moyenne était calculée en divisant la somme des longueurs des racines restées en expérience par le nombre de celles-ci; toutefois cette mesure n'atteignait que la concentration en question, les tubes qui portaient le même numéro dans les autres séries n'étaient pas éliminés.

Les trois mesures fournissent trois longueurs moyennes : longueur moyenne au départ, après 24 heures et après 48 heures de culture. La différence entre la longueur moyenne après 24 heures de culture et la moyenne initiale représente l'accroissement moyen durant les premières 24 heures; la différence entre la longueur moyenne après 48 heures de culture et la moyenne après 24 heures de culture donne l'accroissement moyen durant la deuxième journée de culture. La somme de ces deux accroissements est l'accroissement moyen total durant toute la durée de l'épreuve. Ces différents accroissements moyens sont comparés aux accroissements correspondants du témoin et sont rapportés à 100, de telle sorte que l'on obtient trois pourcentages de croissance : pourcentage de la croissance moyenne durant la première journée, pourcentage de la deuxième journée, pourcentage moyen pendant la durée totale de l'épreuve. Ces pourcentages servent à établir des tableaux et des courbes.

Les tableaux

Nous donnerons dans chaque tableau, en fonction des différentes concentrations, d'une part le pH des solutions initiales et des liquides de culture et, d'autre part, les accroissements moyens de différentes séries. Ces accroissements sont indiqués en valeur absolue et en valeur relative (pourcentage) par rapport à l'accroissement de la série-témoin pour les différentes périodes de l'essai : 0 à 24 heures, 24 à 48 heures, 0 à 48 heures. Enfin, en tête de chaque tableau, figurent les longueurs moyennes de la série-témoin aux différents temps de l'épreuve.

Exemple numérique

A titre d'exemple nous donnons ici les mesures relatives à des essais effectués avec des solutions de chlorhydrate de cocaïne de titres divers chauffées préalablement à l'autoclave à

120° pendant 5 heures; en plus des accroissements moyens nous indiquons les longueurs présentées par chaque racine aux différents temps de l'opération.

Nous attirons l'attention sur le fait que, dans la série à 0,125 pour cent, la moyenne des longueurs, après 48 heures de culture, est moins élevée que la moyenne après 24 heures; cela peut paraître paradoxal et faire croire à une erreur de mesure; il n'en est rien; la mort s'accompagne, comme nous le verrons par la suite, de la perte de la turgescence, aussi certaines racines sont moins longues, mortes, que vivantes.

Dans la série à 0,025 %, à la suite d'un accident, la 10^e graine a dû être éliminée au moment de la troisième mesure; la longueur moyenne devient $389/9 : 43,20$ et l'accroissement moyen, au cours de la deuxième journée, est de $43,20 - 31,70$ soit 11,50.

Les pourcentages sont calculés de la façon suivante : prenons comme exemple la solution à 0,025 %. Nous trouvons que pour un accroissement moyen du témoin de 18 mm., les plantes intoxiquées présentent un accroissement de 7,60 mm. Par suite si, à un accroissement de 18 mm. du témoin correspond un accroissement de 7,80, à un accroissement de 1 mm. du témoin correspond un accroissement de $7,80/18$ et à un accroissement de 100 mm. du témoin correspond un accroissement de :

$$\frac{6,80 \times 100}{18,00} : 37,77$$

Nous dirons que le coefficient de croissance pendant la première journée est de 37,77 %. De même le pourcentage de croissance pendant la deuxième journée est de :

$$\frac{11,50 \times 100}{22,10} : 52,00$$

et le pourcentage total pour toute la durée de l'épreuve est de :

$$\frac{18,30 \times 100}{40,10} : 45,60$$

Il est en outre intéressant de constater que les diverses séries témoins que nous avons cultivées ont toujours donné des résultats très voisins : les longueurs moyennes oscillaient entre 20 et 27 mm. au début de l'épreuve; après 24 heures de culture elles étaient comprises entre 40 et 50 mm. et à la fin de l'épreuve elles atteignaient de 60 à 70 mm.; exceptionnellement une série a été mauvaise, l'accroissement moyen des témoins n'avait pas dépassé 12 mm. le premier jour et 8 mm. le deuxième jour; cet essai a été d'ailleurs recommencé.

Les courbes

Les résultats obtenus dans nos différents essais nous ont servi également à construire des courbes; celles-ci ont été obtenues en portant en abscisses les concentrations des diverses solutions utilisées et en ordonnées les pourcentages de croissance correspondants. Une première courbe (trait plein) résume les résultats obtenus dans la période de 0 à 24 heures, une seconde (pointillé) exprime les résultats de 24 à 48 heures, enfin une troisième courbe (tirets) synthétise les données des deux premières; cette dernière courbe a été obtenue très simplement en adoptant comme ordonnées des points représentatifs des différentes concentrations, la somme des ordonnées correspondantes dans les deux premières courbes. Si le coefficient de croissance est par exemple de 40 % le premier jour et de 50 % le deuxième jour pour une concentration donnée, l'ordonnée dans la courbe moyenne sera au point 90 % des pourcentages de 24 heures. Les ordonnées correspondant aux croissances de 0 à 48 heures doivent, par suite être lues avec une échelle deux fois plus grande que les ordonnées correspondant aux croissances d'une seule journée. Cette nouvelle échelle est indiquée à la partie droite de nos graphiques.

Enfin pour faciliter la construction des courbes nous avons été amenés à limiter nos graphiques aux concentrations intéressantes et à utiliser plusieurs échelles pour nos abscisses.

CONSIDÉRATIONS MORPHOLOGIQUES

Le ralentissement ou l'arrêt de la croissance en longueur ne sont pas les seuls phénomènes qui traduisent l'intoxication des jeunes racines de lupin blanc. Leur aspect morphologique peut, dans certains cas, être profondément modifié.

Nous aurons, à propos de chaque produit, l'occasion de décrire en détail ces modifications morphologiques; cependant les jeunes racines intoxiquées présentent généralement les caractères suivants :

Dans le cas d'intoxications graves, c'est-à-dire lorsque la croissance était arrêtée dès le premier jour, la jeune racine perdait sa turgescence, son extrémité devenait molle et prenait une couleur blanche; parfois à la fin de l'épreuve la racine entière était devenue flasque. Dans les cas d'intoxications très intenses la jeune racine était en outre étranglée au niveau du collet et prenait à cet endroit une coloration brune.

Dans les solutions moins concentrées ou moins actives, des taches brunes apparaissaient puis s'étendaient peu à peu vers la coiffe. Cependant, ces taches n'envahissaient jamais entièrement la jeune racine qui survivait et continuait à croître avec, il est vrai, un retard important.

Quelquefois ces deux phénomènes ont été présentés par la même racine, le premier jour apparaissaient des taches brunes

au niveau du collet et la croissance était très ralentie; à la fin du deuxième jour de l'épreuve, la jeune racine avait cessé de s'allonger et son extrémité était ramollie et blanche.

Nous devons cependant préciser que cette perte de la turgescence et ces variations de coloration correspondaient simplement à la mort de la racine principale. En effet, si une jeune racine ainsi intoxiquée est reportée dans la solution de SHIVE diluée, on voit apparaître au bout de quelque temps de séjour à l'étuve de jeunes radicelles au-dessus du collet. Toutefois la racine principale ne retrouve pas la faculté de s'allonger ou de croître en largeur.

EGNUS en particulier avait déjà signalé que le développement de racines adventives compense souvent l'arrêt de la croissance en longueur de la racine principale. La jeune plante n'est donc pas toujours tuée dans nos essais; la mort de la plante entière ne doit être obtenue que pour des concentrations plus élevées ou pour un séjour plus prolongé dans les solutions toxiques.

GÉNÉRALITÉS SUR LA STRUCTURE DES JEUNES RACINES DE LUPIN BLANC

Obtention des coupes

Ces modifications morphologiques nous ont incité à rechercher si, parallèlement, l'anatomie des racines n'était pas modifiée et nous avons fait systématiquement des coupes dans toutes les jeunes racines.

Ces jeunes racines sont très molles et difficiles à couper. Nous avons d'abord eu recours à la méthode d'inclusion en paraffine. Les jeunes racines, après la dernière mesure, étaient plongées dans l'alcool à 60° pendant au moins 48 heures. Elles étaient ensuite portées pendant 24 heures chaque fois dans les alcools de titres croissants 70°, 80°, 90° et 100°. Elles restaient enfin trois jours dans l'alcool absolu, pendant lesquels on changeait l'alcool chaque jour. Les racines étaient alors plongées dans le toluène pendant huit jours et ensuite dans une solution de paraffine dans le toluène; elles étaient alors incluses dans la paraffine. Les blocs de paraffine obtenus pouvaient être conservés et facilement coupés. Les coupes ainsi préparées étaient soumises à un traitement inverse : déparaffinage dans le toluène, réhydratation dans des alcools de titre décroissant et coloration. L'inconvénient d'une telle méthode réside dans le grand nombre de manipulations qu'elle nécessite. Nous l'avons finalement abandonnée et les jeunes racines étaient simplement conservées dans l'alcool à 60°.

Coloration

Pour colorer ces coupes nous avons utilisé la méthode classique dite de la double coloration. Les réactifs nécessaires sont les suivants :

1° eau de Javel du commerce diluée au 1/3;

2° acide acétique à 10 %;

3° solution de vert d'iode :

vert d'iode	v 1 gr.
alcool à 95°	10 gr.
eau distillée, q. s. p.	1.000 cc.

4° solution de carmin aluné :

carmin n° 40	4 gr.
alun de potassium	5 gr.
phénol	0 gr. 50
eau distillée	100 gr.

La technique de coloration est simple : les coupes sont laissées pendant 15 minutes dans l'eau de javel diluée, temps suffisant pour détruire le contenu de ces jeunes cellules. Elles sont ensuite lavées dans l'eau distillée, puis portées pendant 3 minutes dans l'acide acétique, et enfin à nouveau soigneusement lavées. Les coupes ainsi traitées sont laissées trente minutes dans le vert d'iode; trente minutes en effet sont nécessaires pour que les éléments ligneux très jeunes apparaissent colorés suffisamment. Au sortir du vert d'iode, après avoir été lavées, les coupes sont portées dans le carmin aluné pendant 45 minutes. Les préparations lavées une dernière fois sont montées en glycérine solidifiée (phéniquée à 2 % si l'on veut les conserver) entre lame et lamelle.

Il est donc nécessaire, en vue des comparaisons ultérieures, de faire des coupes dans la même région, la jeune racine étant en période d'organisation et sa structure variant d'un point à un autre; aussi toutes nos coupes ont été faites à 3 mm. environ au-dessous du collet.

Structure des racines avant culture

Quand la jeune racine est suffisamment longue et lorsqu'elle a atteint de 20 à 30 mm., elle est retirée de la mousse et utilisée pour la culture. Sa section, à 3 mm. au-dessous du collet, est ovale, presque ronde et sa structure en est au stade primaire.

L'assise pilifère est constituée par une assise de cellules arrondies, à parois épaisses; les poils absorbants sont encore rares. Au-dessous, deux à trois assises de cellules semblables forment le subéroïde. Les cellules du parenchyme cortical, de plus en plus grandes lorsqu'on s'éloigne de la périphérie, sont polygonales avec des angles arrondis; elles laissent entre elles de nombreux méats surtout vers le centre; leurs parois sont minces et cellulósiques. L'endoderme en voie de différenciation est constitué par une assise de petites cellules rectangulaires à parois minces et cellulósiques sans épaississements latéraux.

Le cylindre central a une section ovale; le péricycle ne comporte, sauf en face du bois primaire où il y en a trois ou quatre, qu'une seule assise de grandes cellules rectangulaires dressées.

Le bois primaire est représenté par deux faisceaux situés aux extrémités du grand axe. Ces faisceaux ne comportent que 6 à 9 vaisseaux qui sont à peu près de même calibre et par ailleurs très difficiles à colorer. Dans certaines coupes, obtenues sur des racines qui mesuraient près de 30 mm., de part et d'autre des fais-

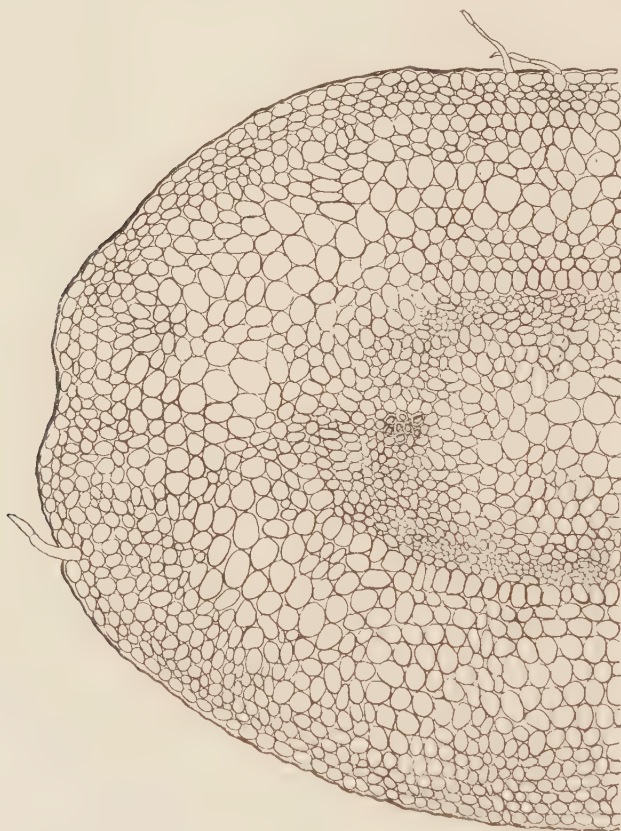


Fig. 6
Dessin d'une coupe faite dans une racine témoin
« avant culture »

ceaux primaires apparaissent des faisceaux secondaires; ces derniers n'ont guère que deux à trois éléments à parois minces.

Le liber est situé à la périphérie du cylindre central sur deux arcs entre les faisceaux du bois. Les tubes criblés sont très colorés dans les coupes et serrés sur une bande étroite.

Le centre du cylindre central est occupé par de grandes cellules à parois minces. L'assise génératrice n'est pas encore différenciée, les méristèmes radicellaires sont encore invisibles.

Structure des racines après culture

Quarante-huit heures plus tard, après un séjour à l'étuve à 20° dans la solution témoin, la jeune racine atteint de 50 à 70 mm. de longueur. La section reste ovale, ses dimensions sont plus

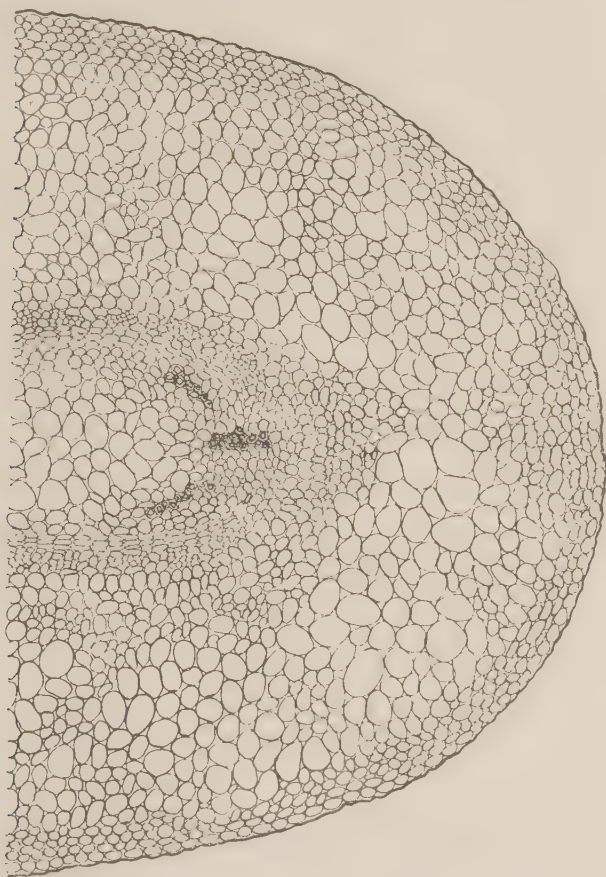


Fig. 7
Dessin d'une coupe faite dans une racine témoin
« après culture »

grandes, l'organisation cellulaire est plus avancée, des formations secondaires sont apparues.

Les poils absorbants de l'assise pilifère sont plus nombreux; les parois des cellules du subéroïde se sont épaissies. Le parenchyme cortical s'est développé; il compte des assises de cellules plus nombreuses et les cellules elles-mêmes sont plus grandes, mais leurs parois sont restées minces et les méats sont nom-

breux. L'aspect de l'endoderme n'a pas varié; ses cellules sont peut-être plus grandes, mais les parois latérales ne présentent aucun épaississement.

La section du cylindre centrale est restée ovale, les cellules du péricycle se sont agrandies sans se multiplier. Le bois primaire compte de 18 à 20 vaisseaux rangés sur deux files dans chacun des faisceaux, le calibre des éléments internes est plus du double de celui des éléments externes. Le bois secondaire est disposé en quatre faisceaux de part et d'autre du bois primaire, chaque faisceau compte de 8 à 10 éléments bien différenciés, les gros vaisseaux sont tournés vers l'extérieur.

L'assise génératrice s'est différenciée, elle est parfaitement visible, et représentée par 4 à 5 assises de cellules rectangulaires à parois minces. Le liber primaire a été refoulé vers l'extérieur, il est réduit à quelques tubes criblés groupés en îlots immédiatement au-dessous du péricycle. Le liber secondaire s'organise.

Aux extrémités du grand axe du cylindre central deux radicules apparaissent sous la forme de cônes de cellules rectangulaires dressées.

Principales anomalies :

La morphologie des jeunes racines intoxiquées ne présentait pas d'importantes variations malgré la diversité des produits utilisés, de même leur anatomie n'était pas, en général, très différente.

Aucune réaction de défense n'a été entrevue, en dehors d'un épaississement plus important des parois du subéroïde. Il n'y eut jamais de lignification de l'endoderme ou du péricycle. L'assise pilifère, le subéroïde et le parenchyme cortical ne présentaient aucune modification sensible; les cellules de ces éléments étaient simplement de dimensions réduites chez les jeunes racines intoxiquées.

Le cylindre central, au contraire, n'était pas seulement plus petit que celui des coupes-témoins mais le développement de ses éléments était retardé. Les tubes du liber étaient moins nombreux et très isolés, les vaisseaux du bois, en nombre réduit, étaient très difficiles à colorer; ce « freinage » n'était visible que chez les jeunes racines qui avaient cessé de s'allonger à la fin de l'épreuve. Il était d'autant plus prononcé que l'intoxication était plus grave. Les jeunes racines qui avaient continué à croître ne présentaient aucune modification importante.

Cependant il y eut deux exceptions à cette règle : dans les solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées durant 15 minutes à 120°, nous avons vu pour certaines concentrations une accélération très accentuée du développement du bois secondaire. Dans les solutions de benzoate de méthyle, en plus des deux radicules qui apparaissent dans les témoins aux extrémités du grand axe du cylindre central, les plantes intoxiquées présentaient à certaines concentrations deux radicules supplémentaires situées aux extrémités du petit axe. Nous verrons plus tard que ces radicules ne sont pas anormales mais hâtives.

Nous aurons l'occasion de donner des détails sur les variations de l'aspect et de la structure des jeunes racines intoxiquées à la suite de chaque corps étudié.

Tout récemment Mlle M. FOURCROY (54) a étudié les modifications anatomiques produites sur des racines par des traumatismes dûs à des agents chimiques.

Dans une première série d'expériences cet auteur cultivait des jeunes racines de lupin dans des solutions acidulées : « des plantules de lupin germées sur sphaignes humides et âgées de 2 à 5 jours ont été mises sur eau acidulée, les solutions employées sont des solutions aqueuses d'acide chlorhydrique dont la concentration varie de 2 à 0,50 % ». Ces plantules sont disposées de telle sorte que le point végétatif de certaines racines soit au contact de la solution, tandis que d'autres y plongent de 0,5 cm. environ. Les récoltes sont faites après 2 à 7 jours. La croissance en longueur est immédiatement arrêtée; à la pointe de la racine se constitue une région renflée en massue et translucide surmontée d'une région très amincie. Enfin dans sa partie supérieure la racine reprend brusquement son diamètre normal.

L'étude anatomique montre que les cellules des tissus parenchymateux sont contractées intensément. Il y a lieu de noter une destruction plus précoce des premiers tubes criblés; quant aux vaisseaux du bois, « d'une manière générale, écrit l'auteur, quelle que soit la portion de la phase de l'évolution vasculaire sur laquelle portent des altérations d'éléments, j'ai toujours constaté une suppléance de ces éléments par des vaisseaux qui leur auraient succédé plus tard dans une évolution normale. » Enfin l'auteur note certaines réactions de défense, les cellules de l'endoderme se sclérifient sur toutes leurs parois; pour des teneurs supérieures à 1 %, on peut constater l'apparition d'un arc de cellules scléreuses extérieurement et latéralement aux vaisseaux alternes.

L'auteur a institué de nouvelles expériences : des plantules de lupin germées sur sphaignes humides et âgées de 2 à 3 jours sont trempées dans une goutte d'acide chlorhydrique (D. 1,19) pendant 4 à 5 secondes, puis elles sont reportées sur le fond de germination. On retrouve alors les modifications histologiques signalées dans la précédente publication, mais avec plus de précision. La destruction des phases primitives entraîne l'apparition précoce d'éléments appartenant à des phases ultérieures dans une évolution normale. Les éléments vasculaires secondaires apparaissent rapidement en grand nombre. Une destruction plus précoce des tubes criblés est accompagnée d'un large développement des plages criblées secondaires.

On peut rapprocher ces conclusions des constatations que nous avons pu faire à propos de certaines concentrations de chlorhydrate de cocaïne chauffées à 120° pendant 15 minutes, auxquelles correspond une accélération du développement des vaisseaux secondaires. Mais en dehors de ce rapprochement nous n'avons rien trouvé de semblable à ce que Mlle M. FOURCROY a décrit. Cependant il n'y a là, croyons-nous, aucune contradiction, car il est naturel que des corps aussi différents que l'acide chlor-

hydrique et la cocaïne et ses produits d'hydrolyse, agissent diversement sur les végétaux.

En somme les corps que nous avons étudiés ne produisent à proprement parler aucune lésion organique sur le lupin, du moins dans les conditions que nous avons définies. Nous avons vu que de nombreux auteurs admettent que certains poisons sont susceptibles de tuer un végétal sans occasionner de lésions.

INFLUENCE DE LA RÉACTION DU LIQUIDE DE CULTURE SUR LA CROISSANCE DU LUPIN BLANC

Les méthodes bactériologiques nous ont habitués à considérer la réaction des milieux de culture comme un des facteurs les plus importants qui conditionnent la croissance microbienne. Les bactériologistes ont montré, par exemple, que les microbes ne cultivent qu'entre deux pH limites et se développent mieux pour certains pH optima. Ils ont en outre mis en évidence l'influence des bactéries sur la réaction de leur propre milieu; celles-ci sont en effet capables d'amener le pH de leur milieu de culture vers un état d'équilibre. Par analogie, on pouvait se demander si le le protoplasma végétal ne jouissait pas des mêmes propriétés et, de nombreux travaux ont été publiés à ce sujet.

Certains auteurs ont étudié les modifications du pH des milieux de culture sous l'influence du développement des végétaux. Un végétal, de la même façon qu'une bactérie, est susceptible d'amener vers un pH d'équilibre la réaction du milieu dans lequel il cultive; c'est ce qu'on a appelé l'« effet ROBBINS ».

L. MEYER (129) dans un important travail sur la constitution chimique des sols a résumé les recherches des auteurs que cette question a intéressés : STILES et JORGENSEN, ARRHENIUS (2), JONES et SHIVE (74), RUDOLPH (179) ITANO FRED et LÉONIS (55), WYETH (212) et enfin ROBBINS (176). Lui-même a recherché un effet semblable à l'effet ROBBINS à propos du rH. Cependant la durée de nos épreuves est trop courte pour que l'effet ROBBINS y apparaisse d'une façon nette.

Les auteurs qui ont étudié l'influence des ions H sur la croissance des végétaux nous intéressent davantage.

VAN LAER et LOMBAERS (209), en 1902, cultivent des embryons d'orge sur du sable lavé et imprégné d'une solution de saccharose à 6 % et de phosphate de potassium. Des additions de potasse et d'acide chlorhydrique permettent d'obtenir différents pH: la croissance n'est possible qu'entre pH 4 et pH 7 et son optimum est en réaction acide.

Selon W. ATKINS (9), en 1922, les végétaux, d'une façon géné-

rale, se développent depuis pH 1,40 jusqu'à pH 8. F. HOPKINS et P. B. WANN (72) montrent que les pH limites de la croissance de la *Chlorella* sont pH 3,40 en zone acide et pH 8,40 du côté de l'alcalinité. Il ne paraît pas y avoir d'optimum défini, la courbe de croissance monte très rapidement jusqu'à un niveau où le taux de croissance est uniforme entre pH 4,60 et pH 7,00. De même, selon STCHEPKINA (197), au-dessous de pH 3,40 la croissance du tabac est inhibée, la zone optima est placée entre pH 8,00 et pH 9,00.

KATCHIONI (80), en 1927, utilise comme plante-témoin le sarrasin qui serait un test très sensible. Dans un milieu où se trouve l'ion chlore, la zone optima de croissance se trouve entre pH 5,00 et pH 6,50. En l'absence de l'ion chlore, cette zone se resserre autour de pH 6,00. En-dessous de pH 4,50 et au-dessus de pH 7,80 jusqu'à pH 9,00 la croissance est ralentie.

Th. DE CAMARGO, R. BOLLINGER et C. DE MELLO (20) cultivent des jeunes caféiers âgés de cinq mois, dans l'eau de source additionnée de sulfate neutre de potassium et d'acide sulfurique. Le pH des milieux de culture s'étend de pH 4,20 à pH 7,20. La zone optima est comprise entre pH 4,20 et pH 5,10.

Nous avons vu que PORT JEAN (156) a montré que la croissance des plantules d'avoine présente un léger optimum entre pH 4,50 et pH 5,25 et un fort optimum entre pH 6,50 et pH 8,00. Cet auteur est d'ailleurs le seul, à notre connaissance, à trouver ainsi deux optima. Enfin A. KOBLONSKA (82) a mis en évidence que la zone de pH permettant la croissance des végétaux varie avec les espèces considérées.

Les auteurs qui ont étudié l'influence de la concentration des ions H sur la croissance des végétaux ont donc observé que cette croissance n'était possible qu'entre des limites assez bien déterminées. Une réaction trop acide ou trop alcaline empêche le développement de la plante, tandis qu'à l'intérieur de la zone de croissance certains pH particulièrement favorables permettent un développement plus intense.

Cependant les données ainsi publiées varient largement suivant les espèces étudiées. Les pH limites permettant la croissance sont compris entre 1 et 4 d'une part et, entre 7 et 9 d'autre part, de plus les pH optima, voisins le plus souvent de 4,50 ou 5,00, peuvent parfois s'échelonner entre 8 et 9.

MACHT indique simplement (107) qu'en faisant varier les quantités de phosphate de potassium contenues dans la solution de Shive, il a pu cultiver ses lupins dans milieux présentant des pH compris entre 4,40 et 7,20, sans observer de différences sensibles. Cette simple constatation nous paraît cependant insuffisante. En effet, si la solution de SHIVE présente un pH normal de 4,50 et un pouvoir tampon appréciable, il est pourtant possible qu'une addition d'une certaine quantité d'une préparation acide puisse modifier sa réaction et l'amener, soit en dehors de la zone de croissance favorable, soit même en dehors de la zone de pH permettant toute croissance.

Nous avons étudié la croissance des jeunes racines de lupin blanc entre pH 1,00 et pH 7,30. La solution de SHIVE précipite en

effet pour une alcalinité plus grande. Les solutions ont été ajustées de pH 4,50 à pH 7,30 par addition de potasse N ou N/10 et de pH 1,00 à pH 4,50 par addition d'acide chlorhydrique ou d'acide orthophosphorique N ou N/10. L'emploi de deux acides différents avait pour but de nous renseigner sur l'influence possible d'un anion supplémentaire (Cl) sur le développement de la plante.

Les solutions étaient préparées par tâtonnement en cherchant quelle était la quantité d'acide ou de base à ajouter à un volume connu de solution de SHIVE pour obtenir le pH désiré, après avoir complété au double du volume initial par addition d'eau distillée. Le pH de la solution finalement obtenue était à nouveau soigneusement déterminé. Les pH ont toujours été mesurés à l'aide de la méthode colorimétrique de CLARK et LUBBS.

Nous avons réuni les résultats obtenus dans les trois tableaux suivants. Les deux premiers sont relatifs à deux essais différents effectués avec l'acide chlorhydrique, le troisième rassemble les résultats obtenus avec l'acide phosphorique.

TABLEAU II
INFLUENCE DE LA RÉACTION
ACIDE CHLORHYDRIQUE ET POTASSE

TEMOIN : LONGUEUR INITIALE : 25,20 m/m
ACCROISSEMENT MOYEN 0 à 24 heures.... 14,00 m/m
— 24 à 48 heures.... 19,90 m/m

pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures	
		valeurs absolues	pourcen- tages	valeurs absolues	pourcen- tages	valeurs absolues	pourcen- tages
1,00	25,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,50	25,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,90	25,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,50	25,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,10	25,00	1,90	13,50	0,00	0,00	1,90	5,50
3,50	25,10	12,30	87,80	7,90	39,60	20,20	59,50
4,00	25,30	12,60	90,00	9,30	48,70	22,30	65,00
4,50	25,20	14,00	100,00	19,90	100,00	33,90	100,00
5,10	25,20	14,90	106,00	16,80	84,40	31,70	93,20
5,60	25,20	16,20	115,00	18,20	91,40	34,40	101,40
6,00	25,20	13,30	95,00	17,00	85,40	30,30	89,00
6,40	25,20	10,10	72,10	14,30	71,80	21,40	72,00
7,00	25,20	9,40	67,10	12,70	63,80	22,10	64,00
7,30	25,10	7,40	52,80	8,60	43,20	16,00	47,00

TABLEAU III
INFLUENCE DE LA RÉACTION
ACIDE CHLORHYDRIQUE ET POTASSE

TEMOIN : LONGUEUR INITIALE : 21,40 m/m
ACCROISSEMENT MOYEN 0 à 24 heures.... 16,70 m/m
— 24 à 48 heures.... 19,40 m/m

pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures	
		valeurs absolues	pourcen- tages	valeurs absolues	pourcen- tages	valeurs absolues	pourcen- tages
2,50	20,70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2,70	20,70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3,00	20,80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3,20	20,60	3.60	21.40	0.00	0.00	3.60	10.00
3,30	20,90	11.00	65.80	5.10	26.20	16.10	44.60
3,50	21,40	12.00	71.90	15.00	77.70	27.00	74.00
3,90	21,50	16.10	89.00	16.40	62.00	32.20	89.00
4,50	21,40	16.70	100.00	19.40	100.00	36.10	100.00
5,10	21,40	18.60	111.40	21.40	110.00	40.00	110.80
5,30	21,30	17.60	105.40	23.00	118.00	40.60	112.40
5,50	21,30	17.80	106.00	21.90	111.30	38.70	107.00
5,60	21,30	15.90	91.00	20.10	103.50	35.40	98.00
5,90	21,30	15.30	91.00	18.80	96.80	34.10	94.40
6,60	21,20	12.80	76.00	14.70	81.00	27.50	76.00

TABLEAU IV
INFLUENCE DE LA RÉACTION ACIDE ORTHOPHOSPHORIQUE

TEMOIN : LONGUEUR INITIALE : 25,20 m/m
ACCROISSEMENT MOYEN 0 à 24 heures.... 13,20 m/m
— 24 à 48 heures.... 15,60 m/m

pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissement de 24 à 48 heures		Accroissement de 0 à 48 heures	
		valeurs absolues	pourcen- tages	valeurs absolues	pourcen- tages	valeurs absolues	pourcen- tages
1,50	25,40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1,70	25,40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1,80	25,40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2,10	25,30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2,30	25,30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2,60	25,40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3,00	25,50	1.40	10.60	0.00	0.00	1.40	4.80
3,30	25,20	9.90	75.00	8.00	51.20	17.90	62.00
3,50	25,20	12.00	90.90	9.50	60.80	21.50	74.00
3,70	25,20	12.80	96.90	8.50	54.40	21.30	73.00
4,50	25,20	13.20	100.00	15.60	100.000	28.80	100.00

L'examen de ces tableaux nous montre d'abord que la croissance des jeunes racines de lupin est impossible dans des solutions dont le pH est égal ou inférieur à 3,00.

Dans des solutions légèrement moins acides (pH 3,10 ou 3,20) la croissance, très faible le premier jour, est totalement arrêtée au bout de vingt-quatre heures de culture.

A partir de pH 3,30 jusqu'à pH 4,50 la croissance se rapproche peu à peu, jusqu'à l'égaliser, de celle de l'étalon. Les différences d'allongement sont surtout marquées au cours de la deuxième journée de culture, et pour pH 3,50, par exemple, les accroissements pendant la première, puis pendant la deuxième journée sont respectivement égaux en moyenne, aux trois quarts, puis à la moitié des accroissements correspondants de l'étalon.

Une légère alcalinisation du milieu est sans influence. On observe même, de pH 4,50 à pH 5,50 environ, une très légère stimulation de la poussée.

Enfin, au-dessus de pH 6,00 l'addition de potasse devient défavorable et pour pH 7,30 les accroissements observés ne représentent que la moitié des accroissements de l'étalon.

On observe peu de différence entre les milieux acidifiés par l'acide chlorhydrique ou par l'acide phosphorique, cependant, pour un même pH, le dernier de ces acides paraît un peu moins toxique que le premier.

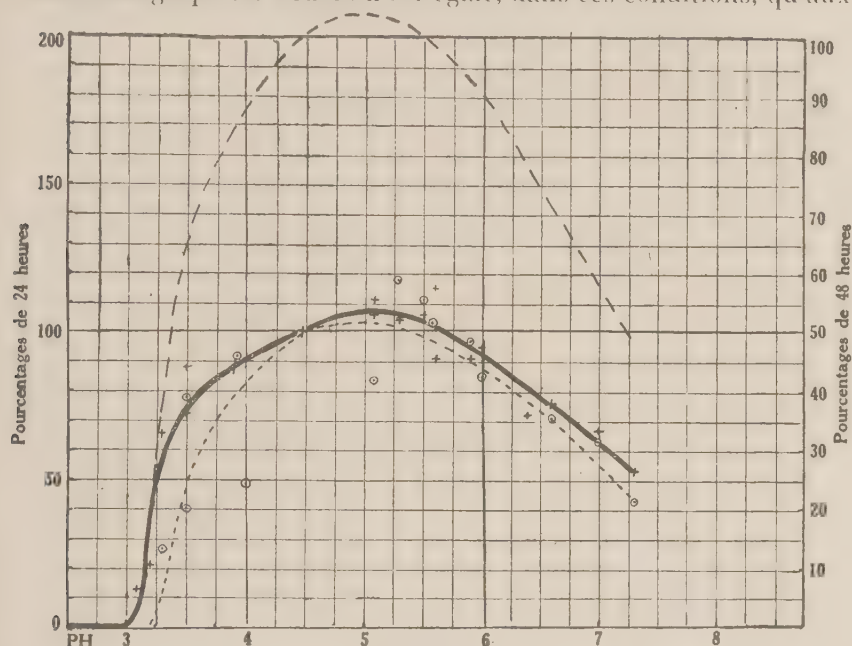
Nous avons recherché si, parallèlement aux différences de croissance, la morphologie et la structure des jeunes racines n'étaient pas modifiées. L'aspect de celles-ci ne présentait rien d'anormal dans les solutions ayant un pH supérieur ou égal à 3,30. Dans les solutions plus acides, les jeunes racines étaient devenues blanches et avaient perdu leur turgescence. Ces modifications étaient d'autant plus marquées que le pH était moins élevé; dans les solutions à pH 3,00 ou 3,20, seule l'extrémité des racines était blanche; dès pH 2,70 les racines étaient ramollies sur la moitié de leur longueur et présentaient un rétrécissement vers le collet. Enfin dans les solutions à pH plus acides, les racines avaient perdu leur turgescence sur toute leur longueur, dès la fin du premier jour.

De même l'anatomie des racines était normale pour les solutions comprises en pH 3,30 et pH 7,30, mais à partir de pH 3,20 le développement des divers éléments du cylindre central avait été ralenti, ce « freinage » était d'autant plus important que les solutions étaient plus acides. Le bois secondaire comptait des vaisseaux à peine différenciés et en nombre de plus en plus réduit. L'importance des faisceaux primaires diminuait de la même façon; le liber était moins altéré mais l'assise génératrice cambiale était à peine visible dès pH 1,90.

Les résultats fournis par les deux essais effectués avec l'acide chlorhydrique et la potasse ont servi à construire les courbes suivantes qui montrent bien l'influence de la concentration des ions H sur la croissance des jeunes racines du lupin. Ces courbes ont été obtenues en utilisant le procédé habituel et en portant en fonction des différents pH les coefficients de croissance correspondants.

Leur examen montre que si l'on néglige les différences de croissance ne dépassant pas 10 % les résultats sont pratiquement équivalents lorsque le pH des solutions est compris entre 4,00 et 6,00.

Une solution de pH 3,50 sera encore utilisable si l'on a soin de se rappeler, à toutes fins utiles, que la croissance normale de zéro à vingt-quatre heures n'est égale, dans ces conditions, qu'aux



Courbe N° 1
Influence de la concentration des ions H sur la croissance des Lupins :

—	Pourcentages de 0 à 24 heures.
- - -	— 24 à 48 heures.
· · ·	— 0 à 48 heures.

trois quarts de celle de l'étalon. Enfin, dans certains cas, on pourra utiliser, sans la réajuster au préalable, une solution de pH 3,30, à condition que l'influence du produit dissous ne puisse pas être confondue avec l'action des seuls ions H. Ce sera, par exemple, le cas d'un produit très toxique inhibant toute croissance. Cette licence se justifie par l'examen de la courbe : le développement des jeunes racines, malgré l'acidité, est encore suffisamment appréciable pour permettre de saisir l'influence propre du toxique. D'autre part, l'absence de toute altération, aussi bien morphologique qu'anatomique, chez les jeunes racines qui ont cultivé dans les solutions à pH 3,30 laisse à penser que cette acidité, qui retarde la croissance, n'intoxique pas à proprement parler les jeunes racines.

Enfin, nous avons mesuré, à nouveau, les pH des milieux de

culture à la fin de l'épreuve sans trouver de variation appréciable. Ceci ne doit pas nous étonner, car tous les auteurs qui ont étudié l'effet ROBBINS n'ont trouvé des modifications qu'après un temps de culture assez long. En particulier JOHNES et SHIVE ont constaté que le pH de la solution de SHIVE n'était amené vers pH 5,20 qu'après cinquante-deux jours. La présence de sels tampons, et surtout la durée très courte de notre épreuve, expliquent suffisamment pourquoi nous n'avons pas retrouvé l'effet ROBBINS.

En résumé, nous avons toujours opéré de la façon suivante :

Les graines de lupin sont mises à gonfler dans de l'eau conduite pendant vingt-quatre heures. Les graines sont placées à plat sur un lit de mousse humide (500 % d'eau) disposé dans des plateaux émaillés et portées à l'étuve à 20° où elles germent. La germination dure entre deux et trois jours; quand les germes ont atteint de 20 à 35 mm. de longueur, les graines sont sorties de la mousse, les racines sont mesurées, en prenant comme point de repère le collet. Les plantes sont portées alors dans les solutions à étudier. Une solution témoin est préparée par addition d'un volume d'eau distillée à un volume de solution de SHIVE, le pH de cette solution témoin est de 4,50. Les solutions aqueuses des produits à étudier sont ajoutées à un volume égal de solution de SHIVE et réparties dans des tubes à essai. Les graines reposent sur le bord des tubes à essai, seule la racine trempe dans le liquide, presque sur toute sa longueur, car la solution vient effleurer les bords du tube. Chaque série comporte dix graines. Les tubes sont placés dans une étuve à 20°, à l'obscurité, pendant vingt-quatre heures d'abord, les jeunes pousses sont mesurées à nouveau; puis elles sont reportées dans l'étuve vingt-quatre nouvelles heures et une dernière mesure est effectuée. Ces mesures permettent l'établissement de longueurs moyennes et, par différences, d'accroissements moyens. Ces accroissements moyens, comparés aux accroissements de la série témoin, sont rapportés à 100; on obtient ainsi des pourcentages de croissance de zéro à vingt-quatre heures, de vingt-quatre à quarante-huit heures et de zéro à quarante-huit heures. Ces pourcentages constituent la base de toutes les comparaisons que les résultats obtenus permettent d'envisager.

Les jeunes racines ne peuvent se développer que dans des milieux de culture dont la réaction est comprise entre pH 3,00 et pH 8,00. Il est préférable que le pH des milieux de culture soit compris entre pH 4,00 et pH 6,00; cependant, on peut utiliser des solutions dont le pH ne sera pas inférieur à 3,30, lorsque nulle confusion ne sera à craindre entre l'action toxique propre de la solution et l'influence des ions H; cela dans le but d'éviter un ajustement des milieux, toujours gênant en raison des modifications qu'il provoque. L'alcalinisation, lorsqu'elle sera nécessaire, sera obtenue par addition de potasse N ou N/10 afin d'éviter l'apport d'ions nouveaux.

Enfin l'étude morphologique et anatomique des racines peut conduire, dans certains cas, à des renseignements utiles pour l'interprétation des résultats.

CHAPITRE III

INFLUENCE DES SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE SOLUTIONS FRAICHES ET SOLUTIONS STÉRILES SUR LA CROISSANCE DU LUPIN

Dans ce troisième chapitre, nous avons étudié l'influence de simples solutions de chlorhydrate de cocaïne dans l'eau distillée sur le développement des jeunes racines de lupin blanc. Ces solutions, de titres variables, étaient essayées, soit aussitôt après leur préparation, soit après avoir été chauffées pendant des temps fort différents, soit enfin après avoir été stérilisées à l'autoclave et conservées à la température du laboratoire pendant plusieurs mois et même plusieurs années.

Nous pourrions ainsi vérifier si les techniques phytopharmacologiques sont capables de mettre facilement en évidence les altérations qui se produisent au sein des solutions de chlorhydrate de cocaïne, sous l'influence du chauffage et du vieillissement. Il sera ensuite intéressant de rapprocher les résultats ainsi obtenus à l'aide d'un test végétal, des connaissances acquises grâce à d'autres méthodes, méthodes physiques, chimiques ou pharmacologiques.

SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE NON CHAUFFÉES

Le chlorhydrate de cocaïne que nous avons utilisé au cours de tout ce travail était un chlorhydrate de cocaïne officinal d'usage courant; le même lot de ce sel nous a servi à préparer toutes nos

solutions. Celles-ci étaient obtenues, soit en faisant dissoudre, à froid, le chlorhydrate de cocaïne dans la plus grande partie de l'eau distillée et en complétant ensuite au volume nécessaire, soit, pour les solutions moins concentrées, par simple dilution d'une solution mère. Le pH de ces solutions était déterminé aussitôt après leur préparation en utilisant la méthode colorimétrique de CLARK et LUBBS. Pour les essais, les solutions étaient additionnées d'un volume égal de solution de SHIVE, et on mesurait à nouveau le pH des liquides de culture ainsi obtenus, avant d'étudier leur influence sur la croissance des lupins. D'une façon générale, il ne s'est jamais écoulé plus de trois heures entre le moment où le chlorhydrate de cocaïne a été dissous dans l'eau distillée et l'instant où les jeunes racines ont été mises à cultiver à l'étuve.

Les résultats obtenus au cours de trois séries d'épreuves sont réunis dans le tableau n° 5. Les mesures des témoins qui ont servi aux comparaisons figurent en tête du tableau.

L'examen de ce tableau montre que si le chlorhydrate de cocaïne employé donnait des solutions légèrement acides, les pH des liquides de cultures sont cependant tous compris dans la zone favorable à la croissance. Les jeunes racines n'ont pas pu se développer dans les solutions de chlorhydrate de cocaïne à 2,50 % et à 2 %, elles sont mortes au bout de vingt-quatre heures dans la solution à 1,25 %, et leur croissance ne représente, pendant la première journée, que 31 % de celle de l'étalon. Dans la solution à 0,50 %, les racines, quoique très retardées dans leur développement, continuent à s'allonger. Enfin, à partir de 0,125 %, leur croissance oscille autour de 80 %. D'une façon générale, et comparativement aux séries témoins, la croissance a été plus ralentie, pendant la deuxième journée que pendant la première, surtout pour les solutions concentrées.

Seules les jeunes racines qui ont été cultivées dans des solutions de titres élevés ont présenté quelques anomalies morphologiques. Au bout de vingt-quatre heures de séjour dans une solution à 2,50 %, l'extrémité des racines était devenue blanche et avait perdu sa turgescence, ces modifications s'étendaient à la racine entière à la fin de l'épreuve; dans la solution à 1,25 %, les racines, le premier jour, étaient tachetées de brun au-dessous du collet; ces taches devenaient plus nombreuses et plus foncées le deuxième jour, et on notait en même temps le blanchissement et le ramollissement de l'extrémité des racines. Enfin dans les solutions à 0,50 et 0,375 %, les jeunes racines montraient les mêmes taches brunes, mais leurs extrémités étaient intactes.

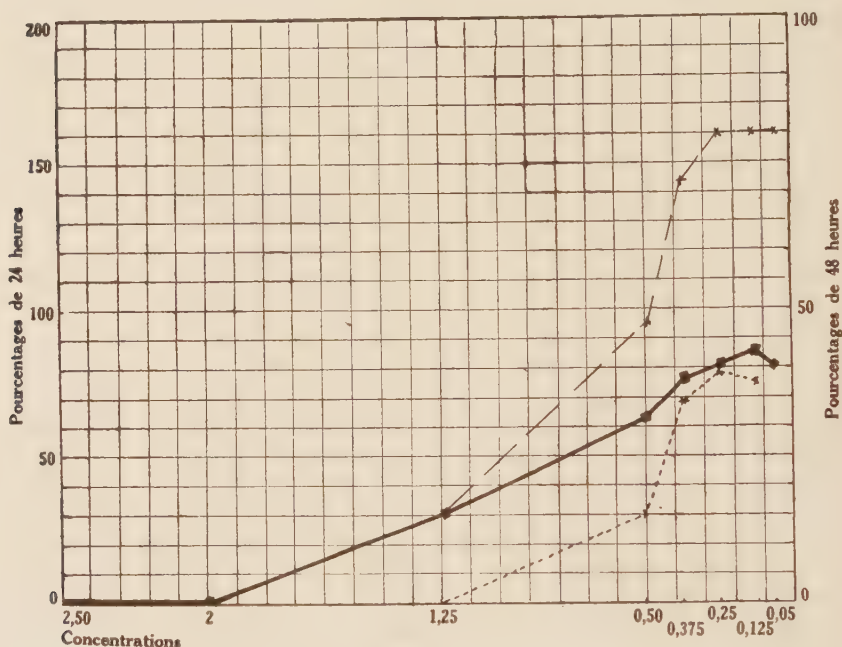
Parallèlement la structure des racines était modifiée. Si aucune anomalie n'était visible dans les tissus extérieurs au péricycle, les faisceaux du bois primaire et surtout ceux du bois secondaire comptaient d'autant moins d'éléments que les solutions étaient plus concentrées. Ce retard dans le développement des éléments ligneux était surtout sensible jusqu'à la concentration de 0,50 pour cent. L'assise génératrice cambiale et les méristèmes radicaux n'étaient nettement différenciés chez les jeunes racines, que pour les solutions de titres inférieurs à 0,50 %.

TABEAU V
SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE NON CHAUFFÉES

TEMOIN N° 1 : LONGUEUR INITIALE : 28,10 m/m ACCROISSEMENT MOYEN : 0 à 24 h..... 19,90 22,20 24,50 m/m
 TEMOIN N° 2 : — 29,00 m/m — 24 à 48 h..... 26,20 22,80 13,60 m/m
 TEMOIN N° 3 : — 29,70 m/m.....

Concentra- tions des solutions primitives	pH des solutions primitives	Concentra- tions des milieux de culture	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures		Séries N°
					Valeurs absolues	Pourcen- tages	Valeurs absolues	Pourcen- tages	Valeurs absolues	Pourcen- tages	
5,00	3,50	2,50	4,20	24,40	0	0	0	0	0	0	1
4,00	3,60	2,00	4,20	29,00	0	0	0	0	0	0	2
2,50	3,70	1,25	4,20	28,10	6,30	31,65	0	0	6,30	13,60	1
1,00	3,70	0,50	4,20	28,10	12,70	63,81	8,30	31,70	20,00	45,50	1
0,75	4,10	0,375	4,30	29,70	18,80	76,70	9,40	69,10	28,20	74,00	3
0,50	4,10	0,25	4,30	29,10	18,10	81,50	18,00	78,90	36,10	80,00	2
0,25	4,30	0,125	4,40	29,10	19,20	86,40	17,20	75,00	36,40	80,80	2
0,100	4,30	0,05	4,40	28,10	16,00	80,40	21,10	80,50	37,10	80,45	1
0,075	4,40	0,0375	4,40	29,70	20,90	85,30	14,80	108,00	35,70	93,70	3
0,05	4,50	0,025	4,50	28,10	14,50	72,86	20,80	79,40	35,30	76,57	1
0,025	4,60	0,0125	4,50	29,10	17,70	79,90	15,50	67,90	23,20	73,70	2
0,01	4,60	0,005	4,50	28,90	15,90	79,90	19,60	74,80	35,50	77,00	1
0,005	4,70	0,0025	4,50	28,90	15,90	79,90	18,50	70,60	34,40	74,60	1
0,0025	4,90	0,00125	4,60	29,00	15,40	77,38	21,70	83,00	37,10	80,40	1
0,001	5,00	0,0005	4,60	29,00	16,70	83,90	19,10	72,90	35,80	77,70	1
0,0005	5,10	0,00025	4,70	29,10	20,90	94,10	15,00	66,20	35,90	80,00	2
0,00025	5,20	0,000125	4,70	29,10	20,00	90,00	17,90	78,50	37,90	84,20	2
0,0001	5,30	0,00005	4,70	29,10	21,30	95,90	17,90	78,50	39,20	87,00	2

Si nous réunissons sur un même graphique les principaux résultats du tableau précédent, nous obtenons les trois courbes suivantes qui montrent, en particulier, que pendant la première journée la toxicité diminue proportionnellement à la concentration, pour les solutions comprises entre 0,50 et 2 %. Pour faciliter la construction, les courbes ont été interrompues au moment où le coefficient de croissance atteignait 80 %. Il semble



Courbe N° 2

Solutions de chlorhydrate de cocaïne non chauffées :

- Pourcentages de 0 à 24 heures.
- - - 24 à 48 heures.
- · · 0 à 48 heures.

d'ailleurs, et les expériences ultérieures confirment cette manière de voir, que les résultats sont peu précis et difficiles à interpréter lorsque les coefficients de croissance atteignent 80 % ou sont inférieurs à 115 %.

En résumé la dose minima toxique du chlorhydrate de cocaïne est représentée par une solution à 2 %, et la dose critique correspond à une solution à 1,25 %. Le développement des jeunes racines de lupin est retardé par toutes les solutions d'un titre égal ou supérieur à 0,125 %, mais ce n'est qu'à partir de 0,50 % que l'on observe une inhibition nettement marquée de la croissance. Pour des solutions comprises entre 0,50 % et 2 %, les pourcentages de croissance sont beaucoup plus faibles pendant la

seconde journée de culture que pendant la première, et l'aspect extérieur et la structure des jeunes racines traduisent une intoxication prononcée. Nous pouvons donc retenir les quatre concentrations suivantes qui pourront servir à d'utiles comparaisons : 2 % dose minima toxique, 1,25 % dose critique, 0,50 % dose limite de grosse toxicité et 0,125 % dose limite d'influence. Enfin, nous n'avons aperçu de stimulation de la croissance pour aucune des concentrations étudiées.

Il est intéressant de rapprocher les chiffres que nous avons obtenus des résultats trouvés par différents auteurs (CHARPENTIER, DUBOIS, MOSO, LUTZ, SIGMUND et MACHT) dans leurs essais concernant l'action du chlorhydrate de cocaïne sur les végétaux. La germination des graines de cresson alénois est empêchée par une solution de chlorhydrate de cocaïne à 5 %, comme l'a montré CHARPENTIER; et légèrement accélérée par une solution à 1 % d'après les essais de DUBOIS. Selon Mosso, le chlorhydrate de cocaïne à 1 % et même à 0,50 % s'oppose à la germination du haricot, mais la toxicité disparaît très vite; une solution à 0,10 % est pratiquement sans influence, et pour des concentrations comprises entre 0,01 et 0,001 % on observe une stimulation de la croissance. LUTZ, en 1899, voit mourir, après quelques jours, des plants de *Cucurbita maxima* et d'*Helianthus annuus*, semés dans du sable imprégné d'une solution de chlorhydrate de cocaïne à 1 %. SIGMUND observe que les solutions de chlorhydrate de cocaïne à 0,136 % ne ralentissent pas sensiblement le développement des racines de blé et de colza; les solutions à 0,339 % retardent la croissance des vesces et de l'orge, et les solutions à 0,678 % ralentissent le développement des racines et des tiges, mais non la germination des vesces, du blé et de l'orge. Enfin une solution à 1,158 % est déjà fortement toxique. Des racines de vesces ayant germé dans cette solution n'atteignent que de 1 à 4 mm. au bout de quatre jours de culture et sont « rabougries » au bout de cinq jours, alors que les racines des plantes témoins ayant germé dans l'eau distillée mesurent à ce moment de 22 à 32 mm.

Nous ne pouvons retenir de ces résultats, obtenus à l'aide de méthodes fort différentes de celle que nous avons suivie et à partir d'espèces végétales variées, qu'une impression générale nous permettant de situer l'ordre de grandeur de la toxicité du chlorhydrate de cocaïne. Il semble cependant que les solutions de ce sel à 1 % exercent déjà une action nettement toxique sur les plantes et que les solutions à 0,10 % sont sans action.

Les chiffres obtenus par MACHT sont beaucoup plus intéressants. D'après cet auteur, une solution de chlorhydrate de cocaïne à 2 % empêche la croissance des racines de lupin, une solution à 1,70 % permet un allongement correspondant aux 64/100 de celui de l'étalon, et des solutions de titres inférieurs ou égaux à 0,17 % paraissent sans influence sur le développement des lupins. Bien mieux, pour des concentrations comprises entre 0,00017 et 0,003 %, il y aurait peut-être une stimulation de la poussée.

Les résultats que nous avons obtenus sont très proches de ceux

publiés par D. I. MACHT; les doses toxiques empêchant tout accroissement de la racine sont les mêmes et les doses paraissant constituer la limite de toxicité sont voisines, 0,17 et 0,125 %. Le fait que dans nos essais la toxicité diminue un peu moins rapidement en fonction de la concentration, que dans les expériences de MACHT peut être attribué à la nature du sel employé : chlorhydrate de cocaïne chimiquement pur pour cet auteur et chlorhydrate de cocaïne officinal pour nos essais.

Comme nous l'avons dit tout à l'heure et contrairement aux observations de ASO, NAKAMURA, BOKORNY, NICOLAS et MACHT lui-même, nous n'avons pas observé une stimulation de la croissance. Ce fait est peut-être difficile à mettre en évidence, et nous pouvons rappeler ce que BOKORNY écrivait à ce sujet en 1914 : « Il est vraisemblable que tous les toxiques exercent une action stimulante à des concentrations choisies; cela n'est que théorique, dans la pratique, qui a à compter avec beaucoup de facteurs, les concentrations justes peuvent être rares. »

SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE CHAUFFÉES A L'AUTOCLAVE

Les alterations des solutions de chlorhydrate de cocaïne sous l'action de la chaleur ont donné lieu à de nombreux travaux. Nous avons continué ces essais en étudiant l'influence de solutions chauffées de chlorhydrate de cocaïne sur la croissance des racines de lupin. Parmi les deux facteurs qui conditionnent l'action de la chaleur : température et temps de chauffage, nous n'avons fait varier que le second, et nous avons simplement chauffé nos solutions à l'autoclave à la température de 120°, pendant des temps de plus en plus longs, s'échelonnant de 15 minutes à 48 heures. Pour faciliter les comparaisons les mêmes concentrations ont toujours été employées.

Les solutions, préparées de la manière habituelle, étaient réparties dans des ampoules de 10 cc en verre blanc à peu près neutre. Pour le chauffage, ces ampoules étaient disposées dans des récipients remplis d'eau que l'on plaçait dans un autoclave froid. Celui-ci était alors porté à 120° et maintenu à cette température pendant le temps fixé; quelquefois nous avons été obligé de fractionner le temps de chauffage, l'autoclave froid porté à 120° pendant le jour, refroidissait pendant la nuit et était rallumé dans les mêmes conditions les jours suivants, jusqu'à ce qu'en additionnant les heures de chauffage, on obtienne le temps désiré. Dans tous les cas, les ampoules n'étaient sorties qu'après refroidissement complet de l'autoclave. Le plus souvent elles ont été

utilisées immédiatement après la stérilisation et elles n'ont jamais été employées plus de 6 jours après le dernier chauffage.

Il est important de noter que les solutions de chlorhydrate de cocaïne étaient chauffées à l'autoclave avant d'être mélangées à la solution de SHIVE. Les titres des solutions soumises au chauffage étaient donc exactement le double des titres qui expriment la concentration en chlorhydrate de cocaïne des milieux dans lesquels ont été cultivées les jeunes racines. Cela a une certaine importance, car une solution à 1 % de chlorhydrate de cocaïne stérilisée, puis amenée à 0,50 % par addition de la solution de SHIVE, du fait des modalités de la saponification n'est pas exactement comparable à une solution à 0,50 % de chlorhydrate de cocaïne, dans laquelle on ferait dissoudre les sels de SHIVE, après l'avoir stérilisée. De même les pH, mesurés avant et après chauffage, se rapportent à des solutions dont les titres en chlorhydrate de cocaïne sont le double des titres des milieux de culture.

Solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées 15 minutes à 120°

Nous avons d'abord reproduit les conditions d'une stérilisation ordinaire en maintenant nos solutions pendant 15 minutes à 120°. Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 6.

Nous avons indiqué dans la première partie de ce tableau les mesures qui intéressent les solutions de chlorhydrate de cocaïne dans l'eau distillée, c'est-à-dire leur concentration initiale et leur pH avant et après chauffage. Dans la deuxième partie du tableau, on trouvera les mesures qui se rapportent aux solutions devenues milieux de culture, après addition de la solution de SHIVE (c'est-à-dire les nouvelles concentrations et les pH de culture), et enfin les résultats obtenus.

Conformément aux observations déjà faites par certains auteurs, les solutions dont les concentrations sont comprises entre 3,75 % et 0,025 %, se sont acidifiées sous l'action de la chaleur. On observe, par contre, pour les concentrations égales ou inférieures à 0,01 %, une alcalinisation sous l'action du chauffage. Cette alcalinisation doit sans doute être attribuée à l'alcalinité du verre. Celle-ci intervient dans tous les cas, mais se trouve compensée dès que la proportion de chlorhydrate de cocaïne dissous est suffisante pour libérer une quantité d'acide appréciable.

Les jeunes racines n'ont pas pu se développer dans les milieux à 1,875 %; elles y sont mortes dès le premier jour. La croissance a été très faible, le premier jour, et nulle pendant la seconde journée dans le milieu à 1,25 %. A partir de 0,50 %, les jeunes racines survivent pendant la durée de l'expérience, mais pour cette concentration l'allongement est encore très faible pendant la seconde journée. Enfin, à mesure que la proportion de chlorhydrate de cocaïne diminue, la toxicité décroît, la crois-

TABLEAU VI

SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE CHAUFFÉES PENDANT 15 MINUTES A 120°

TEMOIN N° 1 :	LONGUEUR	INITIALE :	26,40	m/m	ACCROISSEMENT MOYEN :	0 à 24 h.....	17,10	24,50	11,40	m/m
TEMOIN N° 2 :	—	—	29,70	m/m	—	24 à 48 h.....	25,10	13,60	13,50	m/m
TEMOIN N° 3 :	—	—	29,40	m/m	—	—	—	—	—	—

Concentra- tions des solutions primitives	pH des solutions primitives	pH des solutions chauffées	Concentra- tions des milieux de culture	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures		SERIES N°
						valeur absolue	pourcen- tages	valeur absolue	pourcen- tages	valeur absolue	pourcen- tages	
3,75	3,70	3,50	1,875	3,80	29,40	0	0	0	0	0	0	3
2,50	3,70	3,50	1,25	3,90	29,40	1,50	12,50	0	0	1,50	6	3
1,00	3,70	3,50	0,50	4,00	26,40	10,20	59,60	5,60	22,22	15,80	37,40	1
0,75	4,10	3,50	0,375	4,10	29,40	8,70	73,80	9,40	69,60	18,10	72,60	2
0,50	4,10	3,70	0,25	4,10	29,40	8,70	73,80	11,00	81,80	19,70	79,10	3
0,25	4,30	3,90	0,125	4,30	29,40	9,70	82,10	12,90	95,50	22,60	91,00	3
0,10	4,30	4,10	0,05	4,50	26,40	10,20	59,60	16,80	66,90	27,00	63,98	1
0,075	4,40	4,10	0,0375	4,30	29,40	10,60	89,80	16,10	119,20	26,70	107,00	3
0,05	4,50	4,20	0,025	4,60	26,40	12,00	70,00	18,40	73,30	30,40	72,00	1
0,025	4,50	4,30	0,0125	4,60	29,70	13,50	79,10	16,40	120,00	35,80	93,90	2
0,01	4,60	5,70	0,005	4,90	26,40	13,50	78,90	18,50	73,70	32,00	75,80	1
0,005	4,70	5,60	0,0025	4,90	26,40	13,60	79,50	22,90	91,20	36,50	84,10	1
0,0025	4,90	5,80	0,00125	4,90	27,40	17,10	100,00	22,80	77,68	36,60	86,70	1
0,001	5,10	6,00	0,0005	4,90	26,40	17,10	100,00	22,80	90,80	39,90	94,50	1
0,0005	5,10	6,00	0,00025	4,90	29,70	22,10	90,00	17,00	125,00	39,10	102,00	2
0,00025	5,20	6,00	0,000125	5,00	29,70	21,80	89,00	14,20	104,00	36,00	94,48	2
0,0001	5,30	6,00	0,00005	5,10	29,70	22,80	93,00	14,20	104,00	37,00	91,10	2

sance atteint 80 % de celle de l'étalon dans la solution à 0,125 % et, à partir de cette dilution, les différences avec la série témoin sont très faibles. Enfin, si l'on compare les pourcentages de croissance pendant les deux journées de l'essai, on constate que l'allongement des racines est surtout retardé de 24 à 48 heures, pour les solutions concentrées (de 0,375 à 1,875 %), tandis que l'on observe le phénomène inverse pour les solutions diluées.

Au point de vue morphologique, les racines qui avaient été cultivées dans des solutions à 1,875 et à 1,25 %, présentaient dès le premier jour, immédiatement sous le collet, des taches bru-

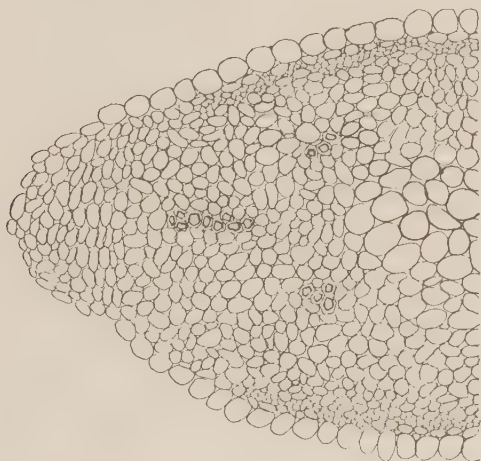


Fig. 8

Coupe faite dans une racine de Lupin après 24 heures de culture dans une solution de chlorhydrate de cocaïne à 1,25 % chauffée 15 minutes à 120° (cylindre central)

nes très prononcées; à la fin de l'expérience, le collet était étranglé sur 2 mm. environ, et l'extrémité des racines était devenue blanche et molle sur une longueur de 10 à 15 mm. Les racines développées dans les solutions à 0,50 % et 0,375 %, ne montraient aucune tache brune, mais leur extrémité était devenue blanche et molle à la fin des 48 heures, quoique ces racines aient continué à s'allonger pendant les premières heures de la dernière journée. Enfin l'aspect des jeunes racines des solutions moins concentrées ne présentait rien d'anormal.

L'examen de la structure de ces racines nous a permis de noter des modifications intéressantes.

L'assise pilifère, le parenchyme cortical et le péricycle n'avaient subi aucune altération appréciable dans aucune des solutions.

Comme dans le cas des solutions de chlorhydrate de cocaïne non chauffées on observait chez les jeunes racines, qui s'étaient

développées dans des solutions concentrées, un retard dans la différenciation des éléments du cylindre central. Les faisceaux du bois primaire et surtout ceux du bois secondaire comptaient moins d'éléments que chez les témoins : 15 à 16 vaisseaux primaires contre 10 à 20 et seulement 3 à 6 secondaires par faisceau contre 8 à 10 dans les témoins : l'assise génératrice était très peu différenciée.

Par contre on observait le phénomène inverse chez les racines ayant été cultivées dans des solutions dont les concentrations variaient entre 0,50 et 0,05 %. Dans ce cas, les faisceaux ligneux

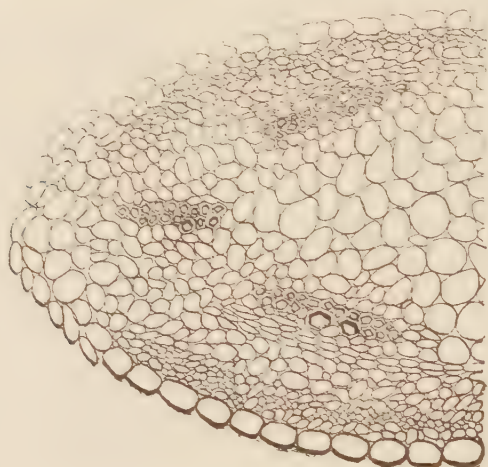


Fig. 9

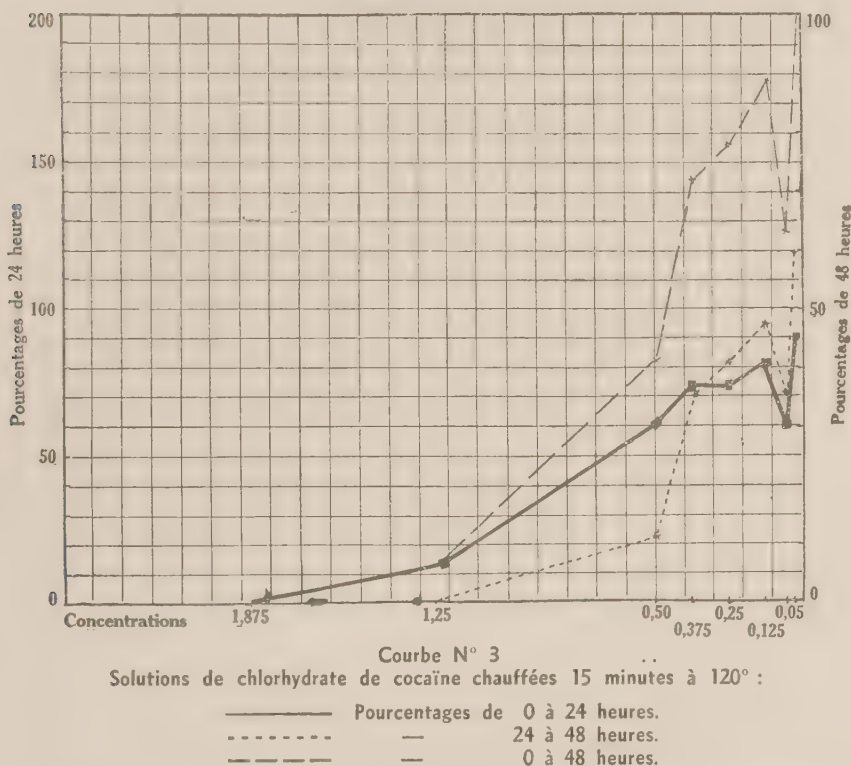
Coupe faite dans une racine de Lupin après 24 heures de culture dans une solution de chlorhydrate de cocaïne à 0,125 % chauffée 15 minutes à 120° (cylindre central)

secondaires deviennent de plus en plus importants avec la dilution : le nombre des vaisseaux augmente, leur forme devient plus parfaite. A partir des solutions à 0,05 %, ces phénomènes vont en régressant, et dès 0,005 % les coupes ne diffèrent plus des préparations témoins. Les radicelles sont dans tous les cas parfaitement différenciées. Nous avons figuré (fig. 8) la structure d'une racine qui avait été cultivée dans la solution à 1,25 % : le « freinage » y est parfaitement net, l'assise génératrice n'est pas différenciée, les radicelles sont peu développées, le liber et le bois sont loin d'être ce qu'ils sont dans les coupes témoins.

La figure 9, qui représente une coupe faite dans une racine ayant été cultivée dans la solution à 0,125 % est très différente : le bois secondaire s'est développé en très forte proportion et forme deux bandelettes allongées tangentiellement et un peu obliquement de chaque côté de la file radiale des vaisseaux pri-

maires; les vaisseaux sont parfaitement différenciés et faciles à colorer. Les tubes criblés dessinent un arc continu d'une faible épaisseur. L'assise génératrice est très développée.

Les chiffres donnés au tableau précédent nous ont servi à construire les courbes suivantes qui montrent que, pour les concentrations comprises entre 0,125 % et 1,875 %, la toxicité des solutions décroît régulièrement avec la dilution. La courbe représentative des croissances de 0 à 24 heures s'élève en effet gra-



duellement jusqu'à la concentration de 0,125 %. Elle est alors brisée par une série d'accidents.

En résumé, la dose minima toxique du chlorhydrate de cocaïne chauffé en solution pendant 15 minutes à 120°, est représentée par une solution à 1,875 %; la dose critique correspond à une solution à 1,25 %. Les solutions sont particulièrement toxiques jusqu'à la dilution de 0,50 %, mais à partir de 0,125 % la toxicité a pour ainsi dire disparu. D'une façon générale, on peut dire que les solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées pendant 15 minutes à 120°, ne sont guère plus nuisibles pour les racines de lupin que des solutions de chlorhydrate de cocaïne de même titre récemment préparées et non chauffées.

TABLEAU VII
SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE CHAUFFÉES PENDANT 2 HEURES A 120°

TEMOIN N° 1 : LONGUEUR INITIALE : 23,70 m/m ACCROISSEMENT MOYEN : 0 à 24 h..... 14,50 16,90 m/m
TEMOIN N° 2 : — 23,90 m/m 24 à 48 h..... 12,90 8,80 m/m

Concentra- tions des solutions primitives	pH des solutions primitives	pH des solutions chauffées	Concentra- tions des milieux de culture	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures		SERIES N°
						valeur absolue	pourcen- tages	valeur absolue	pourcen- tages	valeur absolue	pourcen- tages	
2,50	3,70	2,80	1,25	3,40	23,80	0,20	1,37	0	0	0,20	0,72	1
1,00	3,70	3,00	0,50	3,40	23,80	2,70	18,60	0	0	2,70	9,85	1
0,75	4,10	3,10	0,375	3,60	23,80	3,30	22,70	0	0	3,30	12,00	1
0,50	4,10	3,10	0,25	3,80	23,90	4,80	33,00	4,60	35,70	9,40	34,20	1
0,25	4,30	3,30	0,125	3,80	23,80	8,50	58,60	6,30	48,80	14,80	54,00	1
0,10	4,30	3,30	0,05	4,10	23,80	9,60	66,10	5,80	44,90	15,40	57,60	1
0,075	4,40	3,40	0,0375	4,10	23,80	9,20	63,40	7,60	38,90	16,80	61,00	1
0,05	4,50	3,70	0,025	4,30	23,90	8,40	57,90	5,10	40,00	13,50	49,20	1
0,025	4,50	4,00	0,0125	4,40	23,70	9,70	66,90	10,10	79,10	29,80	72,20	1
0,01	4,60	4,60	0,005	4,50	23,50	10,60	73,00	8,40	65,10	19,00	69,30	1
0,005	4,70	5,50	0,0025	4,90	23,80	15,80	93,50	9,60	109,00	25,40	98,00	2
0,0025	4,90	5,80	0,00125	5,00	24,00	13,30	80,60	7,70	87,40	21,00	81,00	2
0,001	5,10	6,00	0,0005	5,70	23,60	11,30	66,80	7,90	89,70	19,20	74,00	2

Solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées 2 heures à 120°

L'action de la chaleur maintenue pendant 15 minutes à 120° n'accroît que très peu la toxicité des solutions de chlorhydrate de cocaïne. Afin d'obtenir des différences appréciables nous avons porté le temps de chauffage de 15 minutes à 2 heures.

Nous avons procédé de la manière habituelle et nous avons réuni les résultats dans le tableau suivant (Voir tableau n° 7.)

L'acidification des solutions sous l'action de la chaleur est nettement plus marquée que dans le cas précédent. Le pH d'une solution de chlorhydrate de cocaïne à 2,50 % dans l'eau distillée est passé par exemple de 3,70 à 2,80, et l'addition de la solution de SHIVE n'a amené ce pH qu'à 3,40. Pour les concentrations élevées (1,25 % et 0,50 %), les liquides de culture présentent ainsi un pH de 3,40, pH relativement acide qui, nous l'avons vu, suffit à lui seul à ralentir la croissance des racines de lupin. Cependant, comme le ralentissement constaté avec ces solutions est beaucoup plus considérable que celui que l'on observe avec les solutions témoins amenées vers pH 3,30, les résultats de nos essais peuvent être utilisés directement, sans avoir besoin de réajuster les solutions avant d'y faire croître les racines.

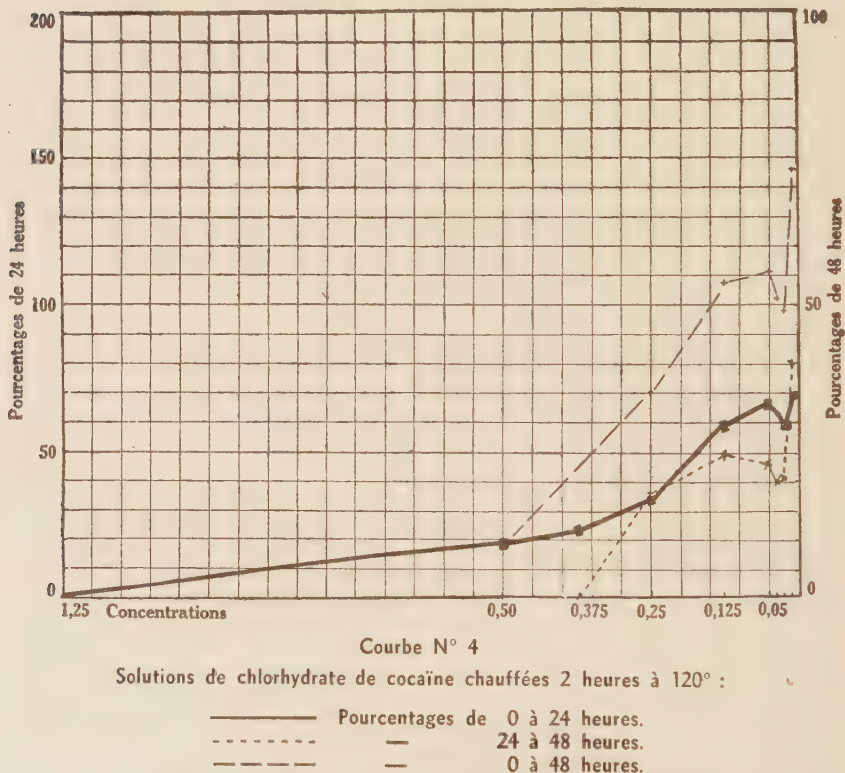
Les jeunes racines sont mortes dans la solution à 1,25 % dès le premier jour, après avoir très peu résisté à l'intoxication. Les solutions à 0,50 et 0,375 %, moins toxiques, n'ont permis un développement notable des racines que de 0 à 24 heures, les jeunes racines étaient mortes à la fin de la première journée. La croissance n'a atteint 50 % que dans les solutions à 0,125 % environ et 80 % que pour des dilutions de l'ordre de 0,0025 %. D'un façon générale, les solutions concentrées sont plus toxiques de 24 à 48 heures que 0 à 24 heures. La résistance de la plante faiblit si l'action du toxique dure. Les différences entre les deux journées de l'épreuve sont moindres dans le cas des solutions diluées; la plante au contraire parvient à lutter victorieusement contre l'intoxication.

Au point de vue morphologique, les jeunes racines ont présenté les symptômes généraux d'intoxication déjà décrits : dans les solutions à 1,25 %, dès le premier jour, leur extrémité était ramollie et blanche sur une portion importante, la région au-dessous du collet était étranglée et uniformément brune. Ces symptômes ne sont apparus sur les racines des solutions à 0,50 % et 0,375 % qu'au cours de la deuxième journée : les racines présentaient quelques taches brunes au niveau du collet après 24 heures de culture, mais la perte de la turgescence, la blancheur et l'étranglement ne sont survenus qu'à la fin de l'expérience.

Pareillement, l'étude anatomique n'a fourni que les conclusions habituelles. Seules les coupes provenant des solutions con-

centrées, de 1,25 à 0,25 %, étaient intéressantes : si les tissus périphériques différaient peu de ceux des témoins, le cylindre central, dans ses faisceaux ligneux surtout, avait été atteint; les éléments du bois étaient moins nombreux, et en outre l'assise génératrice cambiale n'était différenciée qu'à partir des solutions à 0,25 %.

Les courbes obtenues en utilisant les résultats du tableau précé-



dent sont assez différentes de celles que nous avons déjà étudiées. Tandis que pour les solutions de chlorhydrate de cocaïne fraîches ou chauffées seulement 15 minutes, la courbe représentative des croissances de 0 à 24 heures s'élève à peu près régulièrement entre la dose toxique et la concentration permettant une croissance 80 %, dans le cas des solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées 2 heures, cette même courbe présente deux parties principales séparées par un point d'inflexion. D'une part, une première partie faiblement inclinée, comprise entre 1,25 et 0,375 %, souligne la forte toxicité lentement décroissante des solutions les plus concentrées, d'autre part une seconde partie comprise entre 0,375, et 0,05 % montre que dans cette région

la toxicité des solutions chauffées 2 heures diminue beaucoup plus rapidement. L'intervalle qui sépare la dose toxique minima de la dose critique est comparativement plus grand que dans les essais précédents, cependant la courbe des croissances de 24 à 48 heures ne tarde pas à rejoindre celle des croissances de la première journée, et les deux courbes restent ensuite très proches l'une de l'autre. Enfin, la courbe moyenne de 0 à 48 heures ne fait que mieux apparaître l'opposition qui se manifeste entre les solutions concentrées très toxiques et les solutions diluées proportionnellement beaucoup moins toxiques.

En résumé, la dose minima toxique du chlorhydrate de cocaïne en solution dans l'eau distillée, chauffée pendant deux heures à 120°, est représentée par une solution à 1,25 %, la dose critique étant 0,375 %. Les jeunes racines sont sensibles à la toxicité des solutions jusqu'à des dilutions assez grandes, environ 0,0025 %. Comparativement aux solutions simplement chauffées 15 minutes à 120°, on note une diminution importante de la dose toxique et d'une façon générale, la toxicité s'est accrue à toutes les concentrations d'une manière sensible.

Solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées 5 heures à 120°

Nous avons continué nos essais en chauffant à l'autoclave pendant 5 heures à 120° un certain nombre de solutions de chlorhydrate de cocaïne. La série des solutions chauffées débute à la concentration de 0,50 %. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant (Voir tableau n° 8).

Malgré un temps de chauffage deux fois et demi plus long, l'acidification des solutions sous l'action de la chaleur n'est guère plus marquée que dans l'essai précédent. Le pH d'une solution de chlorhydrate de cocaïne à 1 % est passé de 3,70 à 2,90. Les pH des milieux de culture les plus concentrés sont à la limite de la zone utilisable; cependant les résultats ainsi obtenus conservent leur valeur, étant donné la très grande toxicité de ces solutions.

Dans les solutions à 0,50 %, les jeunes racines sont mortes dès le premier jour. La croissance a été excessivement faible jusqu'à la dilution de 0,125 %. Les racines n'ont pu résister que dans des solutions très diluées. Comme précédemment, la résistance des racines dans les solutions concentrées diminue pendant la deuxième journée, au contraire les solutions diluées sont moins toxiques.

Au point de vue morphologique, les racines qui s'étaient développées dans les solutions à 0,50 et 0,375 % ne montraient aucune tache brune; par contre, à la fin de l'épreuve, elles étaient devenues blanches et molles sur toute leur longueur. Dans la solution à 0,25 % la turgescence des racines n'a disparu qu'au

TABEAU VIII

SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE CHAUFFÉES PENDANT 5 HEURES A 120°

TEMOIN N° 1 : LONGUEUR INITIALE : 24,60 m/m ACCROISSEMENT MOYEN : 0 à 24 h..... 18,00 16,90 m/m
TEMOIN N° 2 : — — 23,90 m/m 24 à 48 h..... 22,10 8,80 m/m

Concentra- tions des solutions primitives	pH des solutions primitives	pH des solutions chauffées	Concentra- tions des milieux de culture	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures		SÉRIES N°
						valeur absolue	pourcen- tages	valeur absolue	pourcen- tages	valeur absolue	pourcen- tages	
1,00	3,70	2,90	0,50	3,30	23,40	0,20	1,10	0	0	0,20	0,50	1
0,75	4,10	3,00	0,375	3,40	23,50	1,10	6,00	0	0	1,10	2,70	1
0,50	4,10	3,10	0,25	3,40	23,80	1,00	5,50	0	0	1,00	2,50	1
0,25	4,30	3,20	0,125	3,70	24,00	2,50	13,80	0	0	2,50	6,23	1
0,10	4,30	3,30	0,05	3,90	24,10	6,60	36,60	6,90	31,00	13,50	33,70	1
0,075	4,40	3,30	0,0375	4,10	24,30	7,30	40,50	7,40	33,40	14,70	36,70	1
0,05	4,50	3,50	0,025	4,30	24,90	6,80	37,77	11,50	52,00	18,30	45,60	1
0,025	4,50	3,70	0,0125	4,30	24,60	10,80	59,00	9,20	44,60	20,00	50,00	1
0,01	4,60	4,30	0,005	4,60	24,40	10,60	58,90	15,20	68,70	25,80	64,50	1
0,005	4,70	5,60	0,0025	4,80	24,40	10,20	60,00	7,20	81,00	17,40	67,00	1
0,0025	4,90	5,80	0,00125	5,10	23,90	10,30	60,90	7,70	87,40	18,00	70,00	2
0,001	5,10	6,00	0,0005	5,10	24,00	13,20	78,20	9,40	106,80	22,50	87,00	2

cours de la deuxième journée de culture. Trois racines de la solution à 0,125 % sont restées vivantes et turgescentes, les sept autres sont devenues molles et blanches à leur extrémité sur une longueur de 6 à 8 mm.

Nous avons représenté ci-contre deux coupes : l'une, obtenue à partir d'une racine cultivée dans la solution à 0,50 %, présente un ralentissement du développement des éléments du cylindre central; l'autre, obtenue à partir d'une racine cultivée dans une solution à 0,005 %, présente un aspect semblable à celui des coupes des racines témoins (fig. 7, page 67).

L'examen des coupes faites dans des racines des solutions intermédiaires permet de suivre une accentuation, en allant vers les

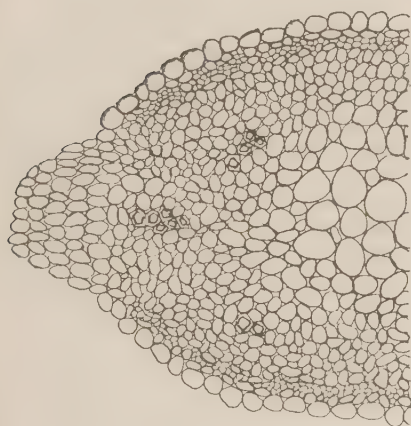


Fig. 10

Dessin d'une coupe faite dans une racine de Lupin après 48 heures de culture dans une solution de chlorhydrate de cocaïne à 0,50 % chauffée pendant 5 heures à 120° (cylindre central)

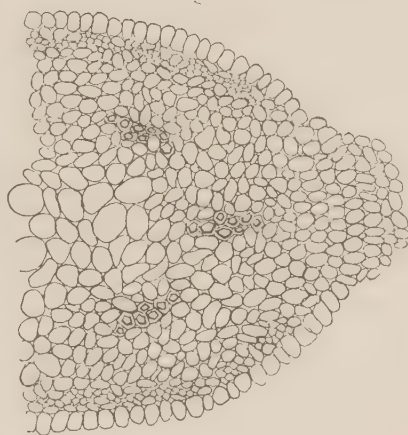


Fig. 11

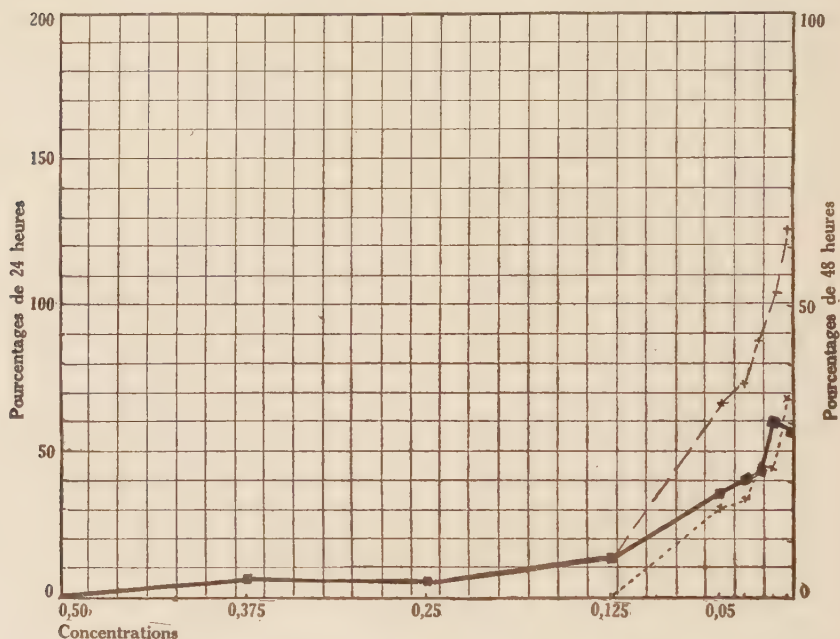
Dessin d'une coupe faite dans une racine de Lupin après 48 heures de culture dans une solution de chlorhydrate de cocaïne à 0,005 % chauffée pendant 5 heures à 120° (cylindre central)

solutions plus concentrées, du « freinage » qui intéresse le développement des éléments du cylindre central; ce « freinage » porte comme à l'accoutumée sur le bois primaire et secondaire, le liber et l'assise génératrice.

Si nous construisons les courbes correspondant à ces essais nous obtenons un graphique qui accentue encore les caractères esquissés par le précédent : la courbe de 0 à 24 heures, qui débute à 0,50 %, s'élève très peu au-dessus de l'axe des abscisses jusqu'à 0,125 %, elle change alors nettement de pente et la toxicité, jusqu'ici considérable, décroît très rapidement. La courbe de 24 à 48 heures s'élève, au contraire, à peu près en droite ligne, mais ne se sépare de l'axe des abscisses qu'à partir de

0.125 %. Enfin, la courbe moyenne de 0 à 48 heures fait ressortir la grosse toxicité des solutions concentrées et la brusque disparition de l'action toxique lorsqu'on arrive aux solutions diluées.

Ainsi aucune végétation n'est possible dans un milieu qui contient 0.50 % de chlorhydrate de cocaïne provenant d'une solution chauffée pendant 5 heures à 120°; la dose critique



Courbe N° 5

Solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées 5 heures à 120° :

————— Pourcentages de 0 à 24 heures.
 - - - - - — 24 à 48 heures.
 ———— — 0 à 48 heures.

(0.125 %) est assez éloignée de cette concentration toxique. A partir de 0.125 %, la toxicité diminue régulièrement.

Comparés aux résultats obtenus avec les solutions chauffées pendant 2 heures seulement, ces chiffres montrent d'abord un recul important de la dose toxique minima qui passe de 1.25 à 0.50 % et un décalage non moins important de la dose critique qui varie de 0.375 à 0.125 %. En outre, l'opposition qui se dessinait précédemment entre les solutions concentrées et les solutions plus diluées s'est accentuée. Il est désormais manifeste que la diminution de la toxicité n'est plus proportionnelle à la dilution.

Solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées 10 heures à 120°

Afin de poursuivre l'étude de l'action de la chaleur sur les solutions de chlorhydrate de cocaïne, des solutions dont les concentrations étaient comprises entre 0.25 % et 0.0005 % ont été chauffées pendant 10 heures à 120°.

A la suite de ce traitement, les solutions, comme le montre le tableau n° 9 n'étaient guère plus acides que les solutions correspondantes qui n'avaient subi que pendant 5 heures l'action de la chaleur. Il est intéressant de noter que les indications acquises par les mesures du pH n'auraient pas permis de distinguer ces deux séries de solutions.

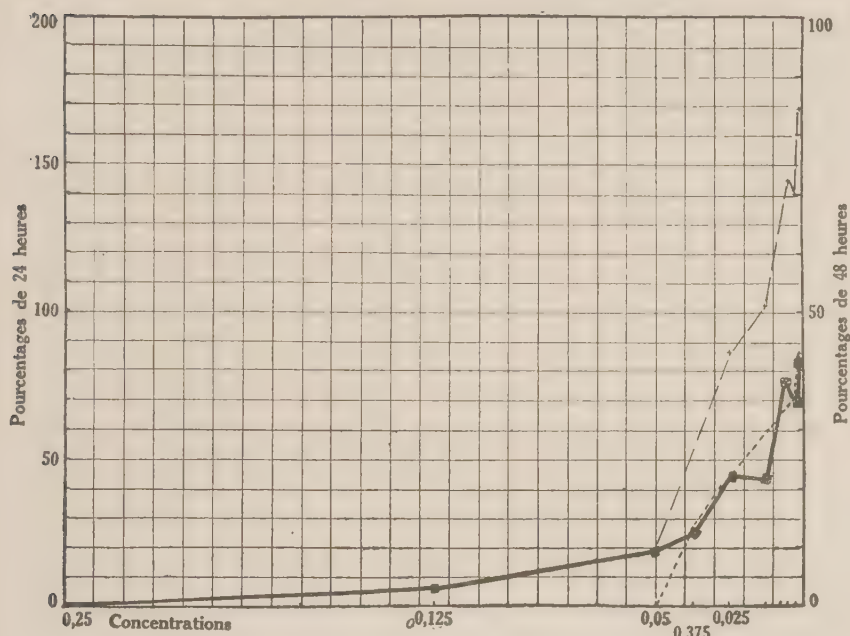
Aucun des milieux de culture n'a nécessité un réajustement de sa réaction; leurs pH étaient proches de la limite de la zone de culture sans qu'on y puisse craindre un inconvénient grave.

L'augmentation de la durée du chauffage s'est encore traduite par un accroissement de la toxicité des préparations de chlorhydrate de cocaïne; les concentrations égales ou supérieures à 0.05 % amènent la mort des jeunes racines, dès le début de l'épreuve pour la solution à 0.25 %, et à partir du deuxième jour pour les solutions à 0.125 et 0.05 %. Ce n'est qu'à partir des solutions à 0.0375 % que les racines résistent à l'intoxication, mais on constate alors que l'action nocive des solutions diminue très rapidement avec leur concentration.

Avant la fin du premier jour de culture, après 10 heures environ dans les solutions à 0.25 %, les jeunes racines étaient déjà mortes; leur extrémité commençait à blanchir; à la fin de l'épreuve, la racine entière était devenue molle, sans toutefois présenter de taches brunes. Les jeunes racines des solutions à 0.125 et 0.05 % montraient le même aspect, après 48 heures seulement. Au-dessous de ces concentrations, il n'y avait pas d'autres modifications morphologiques que la faible longueur des racines.

L'examen de la structure des racines permettait de suivre plus longtemps la toxicité des solutions. Dès la concentration de 0.005 %, les coupes diffèrent des préparations témoins. A partir de cette concentration, on constate que le bois primaire, qui comporte 18 à 20 vaisseaux par faisceaux dans les solutions à 0.01 %, n'en compte plus que de 8 à 10 dans les solutions à 0.05 %. Les éléments ligneux secondaires sont diminués dans la même proportion. L'assise génératrice, normale chez les coupes des solutions à 0.005 %, est peu développée dès 0.025 % et n'est plus différenciée à partir de 0.125 %. Les meristèmes radiculaires sont réduits de moitié dans les solutions à 0.375 %.

Les courbes correspondant à ces essais présentent le même aspect général que celles de la série précédente; mais la courbe représentative de 0 à 24 heures tend, de plus en plus, à se rapprocher d'une hyperbole. Les solutions concentrées, qui tuent les racines entre 24 et 48 heures, ne permettent qu'une croissance



Courbes N° 6

Solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées 10 heures à 120° :

———— Pourcentages de 0 à 24 heures.
 - - - - - — 24 à 48 heures.
 — — — — — 0 à 48 heures.

minime de 0 à 24 heures; au contraire, dès que les racines peuvent survivre, la résistance à l'intoxication s'affirme rapidement.

Les solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées pendant 10 heures à 120° se montrent, d'abord, sensiblement deux fois plus toxiques que les solutions correspondantes chauffées simplement pendant 5 heures; pour les concentrations comprises entre 0,50 et 0,375 % les doses toxiques ou les pourcentages de croissance sont sensiblement deux fois plus faibles dans le premier cas que dans le second. Au contraire, à partir de 0,025 % on n'observe plus de différences entre les deux séries de préparations.

Solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées 24 heures à 120°

Comme nous ne pouvions pas soumettre nos solutions à l'action de la chaleur pendant vingt-quatre heures consécutives, nous avons réparti la durée du chauffage en trois journées successives. Le premier jour l'autoclave froid fut porté à 120° et maintenu à cette température pendant dix heures, la même opération fut répétée le lendemain et le surlendemain mais en ne maintenant chaque fois l'autoclave à 120° que pendant sept heures. Les résultats ainsi obtenus sont indiqués dans le tableau n° 10.

Les concentrations des solutions sont réparties entre 0,125 et 0,0005 %. L'acidification des solutions, sous l'action de la chaleur, n'est pas plus marquée que dans le cas d'un chauffage de cinq heures. Aussi, comme dans les essais précédents, il n'y a pas eu lieu de modifier la réaction des milieux de culture.

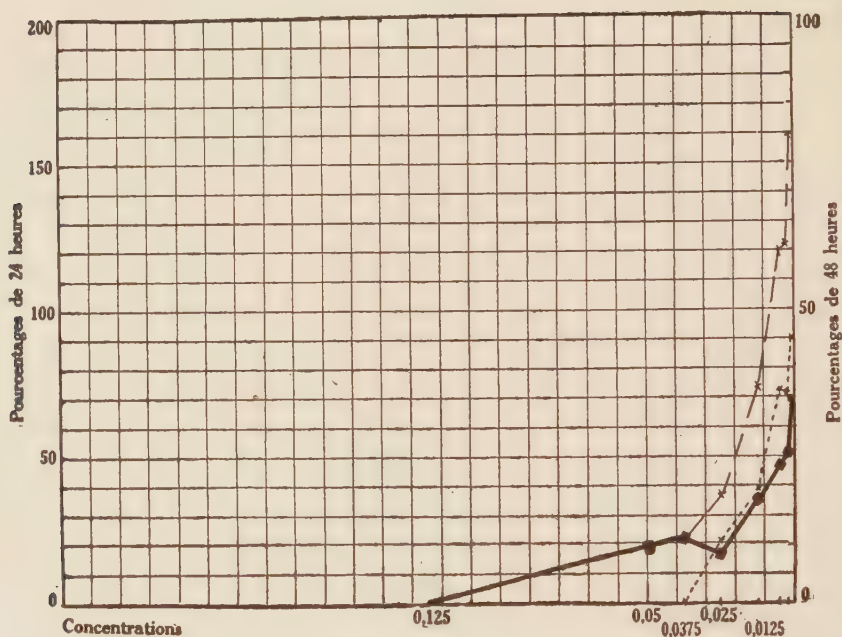
Une concentration de 0,125 % empêche tout allongement des racines, des concentrations égales à 0,05 ou 0,0375 % permettent un accroissement notable le premier jour, mais nul pendant le second, enfin, à partir de 0,025 % la toxicité des solutions diminue très rapidement.

Les jeunes racines des solutions à 0,125, 0,05 et 0,0375 ‰ sont devenues blanches et molles, plus ou moins rapidement, sans jamais présenter de taches brunes; avec les mêmes solutions, la structure des racines montrait les anomalies habituelles: retard dans la différenciation des éléments ligneux secondaires et primaires, des cellules de l'assise génératrice et des méristèmes radicellaires.

L'aspect général des courbes construites en utilisant ces résultats ne diffère pas sensiblement de celui des courbes de l'essai précédent: l'inclinaison de la courbe de 0 à 24 heures est d'abord très faible, puis à partir de 0,025 ‰, la pente augmente brusquement; la courbe de 24 à 48 heures ne débute qu'à partir de 0,0375 ‰, mais s'élève en droite ligne. Enfin la courbe de 0 à 48 heures accentue l'opposition entre les premières solutions très toxiques et les solutions plus diluées très vites inactives.

Ainsi, chauffées pendant 24 heures à 120°, les solutions de chlorhydrate de cocaïne tuent les racines de lupin dès 0,125 ‰, et la dose critique correspond à une solution à 0,0375 ‰. Jusqu'à de très grandes dilutions, les solutions sont douées d'une importante toxicité, mais cette toxicité diminue rapidement à partir de 0,025 ‰. Les solutions chauffées pendant 24 heures sont en général plus toxiques que les solutions chauffées seulement 10 heures, mais l'accroissement de la toxicité ne suit pas l'augmentation du temps de chauffage. Toutefois, les solutions plus diluées ne sont pas plus nocives que les mêmes solutions

chauffées pendant 5 heures seulement. Enfin pour les préparations chauffées pendant 24 heures le coefficient de croissance atteint 50 % pour la solution à 0,005 % et 80 % pour la solution à 0,0005 %.



Courbe N° 7

Solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées 24 heures à 120° :

—	Pourcentages de	0 à 24 heures.
- - -	—	24 à 48 heures.
- . -	—	0 à 48 heures.

Solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées pendant 48 heures à 120°

Nous avons enfin chauffé pendant quarante-huit heures une nouvelle série de solutions de chlorhydrate de cocaïne. Ces quarante-huit heures ont été réparties de la façon suivante : douze heures le premier jour, sept heures les deuxième, troisième, quatrième, cinquième jours, et huit heures le sixième jour ; soit au total quarante-huit heures. Les résultats sont groupés dans le tableau n° 11.

TABLEAU XI
SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE CHAUFFÉES PENDANT 48 HEURES A 120°

TEMPOIN : LONGUEUR INITIALE : 26,40 m/m ACCROISSEMENT MOYEN : DE 0 A 24 HEURES : 22,80 m/m
DE 24 A 48 HEURES : 23,50 m/m

Concentra- tions des solutions primitives	pH des solutions primitives	pH des solutions chauffées	Concentra- tions des milieux de culture	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures	
						Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages
1° SOLUTIONS NON REAJUSTEES											
0,25	4,30	2,60	0,125	3,20	25,90	0	0	0	0	0	0
0,10	4,30	2,80	0,05	3,40	25,90	0	0	0	0	0	0
0,075	4,40	3,10	0,0375	3,60	25,90	0	0	0	0	0	0
0,05	4,50	3,30	0,025	3,70	25,90	2,60	11,40	0	0	2,60	5,60
0,025	4,50	3,70	0,0125	4,10	26,00	2,20	10,00	1,80	7,60	4,00	8,60
0,01	4,60	4,30	0,005	4,50	26,20	6,20	27,00	12,10	51,40	18,30	39,00
0,0025	4,90	7,20	0,00125	5,00	26,30	11,40	50,00	16,10	68,00	27,50	59,00
0,001	5,10	8,00	0,0005	5,20	26,50	17,00	74,00	20,70	88,00	37,70	81,40
2° SOLUTIONS REAJUSTEES											
0,50	4,10	2,40	0,25	4,30	26,10	0	0	0	0	0	0
0,25	4,30	2,60	0,125	4,50	26,00	1,00	4,30	0	0	1,00	2,00
0,10	4,30	2,80	0,05	4,30	26,00	1,70	7,40	0	0	1,70	3,60
0,075	4,40	3,10	0,0375	4,10	26,10	1,50	6,50	0,30	1,20	1,80	3,90
0,05	4,50	3,30	0,025	4,10	26,10	3,20	14,00	0,40	1,70	2,10	7,70

La chaleur a provoqué une acidification très importante des solutions les plus concentrées; le pH d'une solution à 0,50 % est passé de 4,10 à 2,40, celui d'une solution à 0,25 % atteint 2,60 tandis qu'après un chauffage de 24 heures cette même solution présentait seulement un pH de 3,20. Les solutions faibles se sont, au contraire, fortement alcalinisées: une solution à 0,001 % est passée par exemple de pH 5,10 à pH 8,00. Comme nous l'avons déjà dit, ceci est dû sans doute à l'alcalinité du verre.

Les milieux de culture, préparés en additionnant certaines solutions d'un volume égal de liquide de SHIVE, étaient encore relativement très acides. Pour éviter des causes d'erreur, nous avons effectué nos essais à la fois dans les liquides de culture ainsi obtenus et dans les mêmes milieux préalablement amenés à un pH compris entre 4 et 4,50 par addition de solution de potasse N ou N/10. Ces deux séries d'expériences nous ont d'ailleurs donné des résultats très voisins.

Les milieux de culture à 0,125, 0,05 et 0,0375 % non réajustés ont empêché tout accroissement des racines. Les mêmes milieux, amenés à un pH voisin de 4,30, tout en se montrant un peu moins toxiques, n'ont permis que des allongements très faibles. Une solution à 0,25 % dont le pH de culture est 3,20 est toxique, c'est-à-dire tue les racines en 24 heures. Si ce pH est ramené vers 4,50, les racines s'allongent en moyenne d'un millimètre ce qui est fort peu et le pourcentage de croissance s'élève à 4,30 %. Cependant, dans cette solution à pH 4,50, les racines étaient mortes dès la fin de la première journée. Il en est de même des solutions à 0,05 et 0,0375 %.

Pour une concentration de 0,025 %, on observe le premier jour un pourcentage de croissance de 11,40 % avec les milieux non réajustés et de 14 % avec les milieux ajustés, ce qui montre combien les différences observées sont minimales. Enfin, des solutions très diluées à 0,005 % et 0,00125 % ne cessent pas d'être nocives, tandis que déjà la solution à 0,0005 % est, pour ainsi dire, sans action.

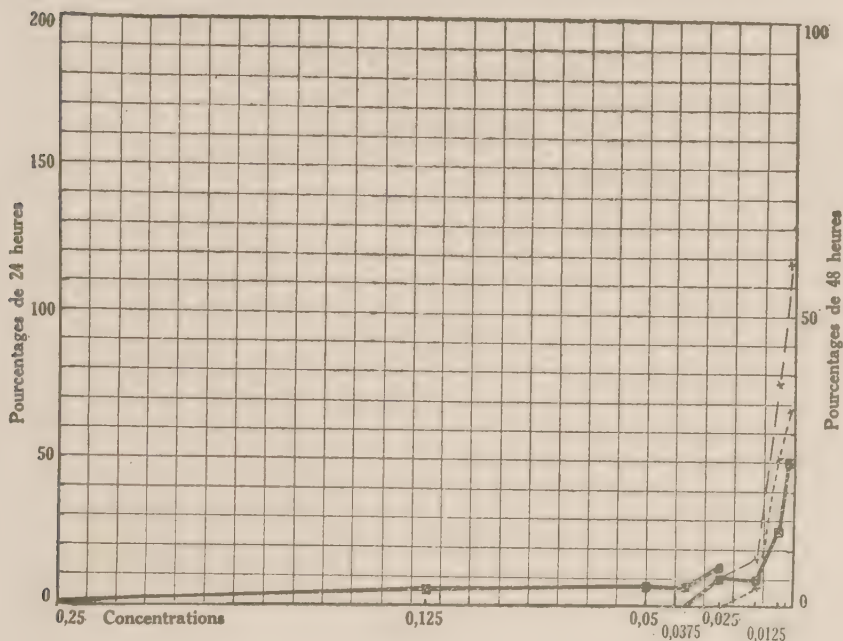
Ainsi, étant donné la grande toxicité de ces solutions, les résultats de la série réajustée sont, en fin de compte, à peu près identiques aux résultats de la série non réajustée. Nous n'avons donc pas commis d'erreur appréciable quand, dans les essais précédents, nous n'avons pas ramené à une réaction plus favorable les solutions très toxiques d'un pH voisin de 3,30.

Au point de vue morphologique, dans les solutions réajustées et non réajustées, les anomalies des racines ont été comparables à celles qui ont déjà été décrites. Les jeunes racines étaient devenues blanches et molles, et présentaient un rétrécissement au collet dans les solutions les moins diluées. Ces symptômes se manifestaient sur une partie plus ou moins importante de la racine, selon la dilution.

L'examen anatomique ne permet pas davantage de différencier les racines des solutions réajustées ou non réajustées. A partir de 0,005 %, au fur et à mesure que les solutions sont plus concentrées, les éléments ligneux primaires et secondaires sont

moins nombreux. L'assise génératrice et les méristèmes radiculaires subissent parallèlement le même retard.

Nous avons utilisé les résultats du tableau précédent pour construire les courbes suivantes. L'allure générale de ces courbes fait



Courbe N° 8

Solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées 48 heures à 120° :

—	Pourcentages de	0 à 24 heures.
- - -	—	24 à 48 heures.
- - - -	—	0 à 48 heures.

ressortir l'opposition entre la grande toxicité des solutions concentrées et la diminution très rapide de la toxicité à partir d'une certaine dilution.

Comparaison des résultats obtenus

Les essais précédents nous ont montré que les altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne, sous l'influence d'un chauffage plus ou moins prolongé, peuvent être décelées soit en suivant les modifications du pH des solutions primitives, soit en étudiant l'action des différentes solutions sur la croissance du lu-

pin blanc. Ces techniques présentent cependant des sensibilités fort différentes.

L'acidification des solutions de chlorhydrate de cocaïne pendant la stérilisation, acidification déjà signalée par différents auteurs et, en particulier, par A. LIOT (94), L. ROY (178) et J. RÉGNIER (171), est bien loin d'être proportionnelle à la durée du chauffage. La diminution du pH, nulle pour un chauffage de 15 minutes et particulièrement importante pour un chauffage de deux heures, devient ensuite très faible si l'on prolonge l'action de la chaleur. Déjà, dans quelques cas, des solutions chauffées pendant 5 heures présentent le même pH que des préparations de même titre, stérilisées seulement pendant deux heures. A partir de ce moment, on n'observe guère de modifications appréciables et seules les solutions chauffées 48 heures présentent des pH nettement plus faibles que les solutions correspondantes chauffées seulement 5 heures. De plus l'acidification des solutions très diluées est masquée, très vraisemblablement, par la légère alcalinité du verre.

Le tableau n° 12, dans lequel nous avons réuni les pH de toutes nos solutions montre bien que, pour une durée de chauffage supérieure à 5 heures, l'étude des modifications du pH initial est incapable de nous renseigner sur les altérations progressives des solutions de chlorhydrate de cocaïne. Une solution de chlorhydrate de cocaïne à 0,50 %, par exemple, de pH initial 4,10 présente successivement après 15 minutes, 2, 5, 10 et 48 heures de chauffage des pH respectivement égaux à 3,70 — 3,10 — 3,10 — 3,10 — 2,40.

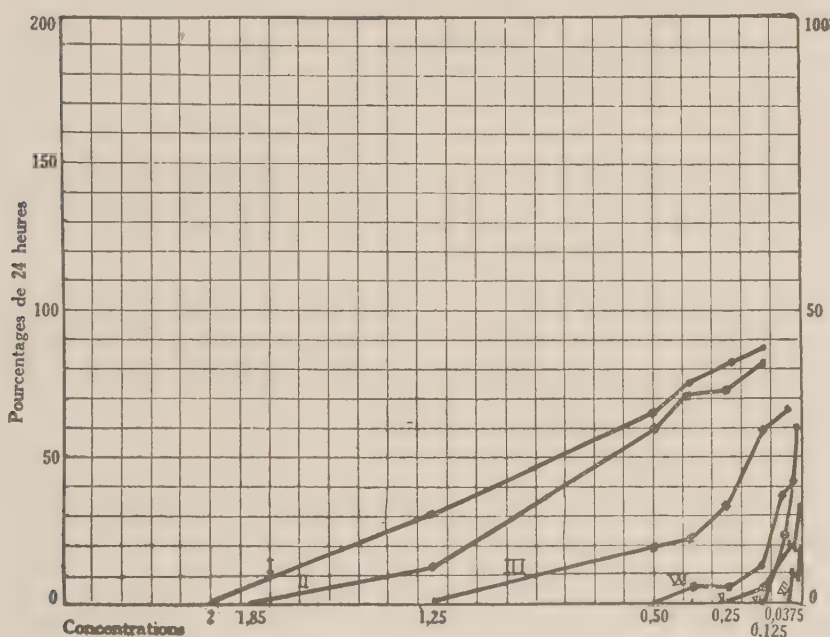
La technique que nous avons suivie permet, au contraire, de différencier des solutions de même titre ayant subi des temps de chauffage différents. On pourra facilement s'en rendre compte en examinant les deux tableaux suivants dans lesquels nous avons indiqué les pourcentages de croissance obtenus en utilisant des solutions de titres divers chauffées pendant des temps progressivement croissants. Le premier tableau correspond à la première journée de culture et le second aux 24 heures suivantes. Comme pour les autres tableaux les titres indiqués représentent la teneur en alcaloïde des liquides de culture (solutions chauffées additionnées d'un égal volume de liquide de SHIVE).

L'augmentation de la durée du chauffage augmente donc progressivement l'action inhibitrice exercée sur la croissance des lupins par des solutions de chlorhydrate de cocaïne d'un titre supérieur à 0,0025 %. Cet accroissement progressif de la toxicité est également mis en relief par les courbes suivantes obtenues en portant en fonctions des différentes concentrations les pourcentages de croissance observés pendant la première journée de culture. Chacune des courbes ainsi tracées correspond à une même durée de chauffage.

Pour faciliter la comparaison de tous ces résultats nous avons indiqué, dans le tableau n° 15 les concentrations qui nous paraissent les plus intéressantes. Dans chaque série d'essai ces concentrations correspondent aux coefficients de croissance de 50

et de 80 % pendant la période de 0 à 24 heures, et aux doses toxiques et critiques.

Les doses toxiques et critiques étant déterminées expérimentalement, leur précision est d'autant plus grande que les concentrations employées sont plus proches les unes des autres. Les concentrations permettant d'obtenir un allongement égal à la moitié de celui de l'étalon ont été obtenues en utilisant les cour-



Courbe N° 9

Influence du chauffage sur les solutions de chlorhydrate de cocaïne

I.	Solutions non chauffées.	
II.	Solutions chauffées	15 minutes à 120°.
III.	—	2 heures à 120°.
IV.	—	5 heures à 120°.
V.	—	10 heures à 120°.
VI.	—	24 heures à 120°.
VII.	—	43 heures à 120°.

bes de croissance résultant des différents essais. Comme dans cette région les courbes représentatives s'élèvent, en général, rapidement et régulièrement, cette détermination peut être faite assez exactement. Enfin, comme nous l'avons déjà dit, les concentrations correspondant à un pourcentage de croissance de 80 % constituent ce que nous pouvons appeler la limite d'influence du produit étudié. En effet, quand les accroissements observés ne

TABEAU XII
VARIATIONS DU PH SOUS L'INFLUENCE DE LA CHALEUR

NATURE des solutions	CONCENTRATIONS DES SOLUTIONS PRIMITIVES %										pH
	5,00	4,00	3,75	2,50	1,00	0,75	0,50	0,25	0,10	0,075	0,05
Non chauffées	3,50	3,60	3,7	3,70	3,70	4,10	4,10	4,30	4,30	4,40	4,50
15 minutes		3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,70	3,90	4,10	4,10	4,20
2 heures				2,80	3,00	3,10	3,10	3,10	3,30	3,4	3,70
5 heures					2,90	3,00	3,10	3,20	3,30	3,30	3,50
10 heures						3,10	3,10	3,30	3,30	3,40	3,70
24 heures						»	3,00	3,00	3,20	3,30	3,40
48 heures						2,4	2,60	2,80	2,80	3,10	3,30

TABEAU XIII
POURCENTAGES DE CROISSANCE OBTENUS DE 0 A 24 HEURES
AVEC DES SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE CHAUFFÉES A 120° DE 0 A 48 HEURES

Nature des solutions	CONCENTRATIONS DES MILIEUX DE CULTURE %													Pourcen- tages
	2,50	2,00	1,875	1,25	0,50	0,375	0,25	0,125	0,05	0,0375	0,025	0,0125	0,005	
Non chauffées	0	0		31	63	76	81	86	80	85	72	79	79	
15 minutes à 120°			0	12	60	73	73	82	60	89	70	79	79	
2 heures à 120°				1	18	22	33	58	66	63	58	67	73	
5 heures à 120°					1	6	5	13	36	40	43	59	59	
10 heures à 120°							0	5	18	24	43	59	68	
24 heures à 120°							0	0	18	21	17	34	48	
48 heures à 120°							0	0	0	0	11	10	27	

TABEAU XIV
POURCENTAGES DE CROISSANCE OBTENUS DE 24 A 48 HEURES
AVEC DES SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE CHAUFFÉES DE 0 A 48 HEURES

Nature des solutions	CONCENTRATIONS DES MILIEUX DE CULTURE %													Pourcen- tages
	2,50	2,00	1,875	1,25	0,50	0,375	0,25	0,125	0,05	0,0375	0,025	0,0125	0,005	
Non chauffées	0	0	0	0	31	69	79	75	80	108	79	68	74	
15 minutes à 120° ..	0	0	0	0	22	69	81	95	67	119	73	120	73	
2 heures à 120°			0	0	0	0	35	48	45	39	40	79	65	
5 heures à 120°					0	0	0	0	31	33	52	44	68	
10 heures à 120°					0	0	0	0	0	25	43	43	77	
24 heures à 120°							0	0	0	0	21	39	72	
48 heures à 120°								0	0	0	0	7	51	

TABEAU XV
COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS
AVEC DES SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE CHAUFFÉES DE 0 A 48 HEURES

Nature des solutions	DOSES toxiques minima	INDICES de toxicité	DOSES critiques	INDICES de toxicité	Concentration des pourcentages 50 %	INDICES de toxicité	Concentrations limites d'influence
Non chauffées ...	2,00	1	1,25	1	0,80	1	0,125
15 minutes à 120° ..	1,875	1,05	1,25	1	0,60	1,33	0,125
2 heures à 120°	1,25	1,60	0,375	3,30	0,17	4,70	0,0025
5 heures à 120°	0,50	4	0,125	10	0,02	40	0,0005
10 heures à 120°	0,25	8	0,05	25	0,017	45	0,0012
24 heures à 120°	0,125	16	0,0375	33	0,003	266	0,0005
48 heures à 120°	0,0375	53,30	0,025	50	0,0012	666	0,0005

diffèrent pas de plus de 20 % de ceux de l'étalon, les résultats obtenus sont souvent difficiles à interpréter.

A côté de ces chiffres, nous avons indiqué ce que nous appelons indice de toxicité. Cet indice, égal à 1 pour les solutions fraîches, traduit l'augmentation de toxicité résultant de l'action de la chaleur. On l'obtiendra très simplement en divisant le titre indiqué pour la solution fraîche par le titre trouvé pour l'essai considéré.

En effet, si les racines de lupin sont tuées dès le premier jour dans une solution fraîche de chlorhydrate de cocaïne à 2 % et dans une solution de chlorhydrate de cocaïne à 0,50 % chauffée 5 heures on a :

2 % $\times$ indice de la solution fraîche = 0,50 % $\times$ indice de la solution chauffée.

$$\text{d'où, indice de la solution chauffée} = \frac{2 \times 1}{0.50} = 4$$

L'examen de ce tableau nous montre que tous les indices de toxicité croissent progressivement au fur et à mesure que l'action de la chaleur se prolonge et que, pour un même temps de chauffage, ces indices augmentent dans l'ordre suivant : dose toxique, dose critique, concentration permettant une croissance de 50 %.

L'ensemble de ces résultats nous conduit aux conclusions suivantes :

1° Le chauffage à l'autoclave augmente progressivement la toxicité des solutions de chlorhydrate de cocaïne pour les racines de lupin.

2° Les solutions de chlorhydrate de cocaïne récemment préparées et non chauffées sont peu nocives, des concentrations élevées sont nécessaires pour arrêter le développement des racines.

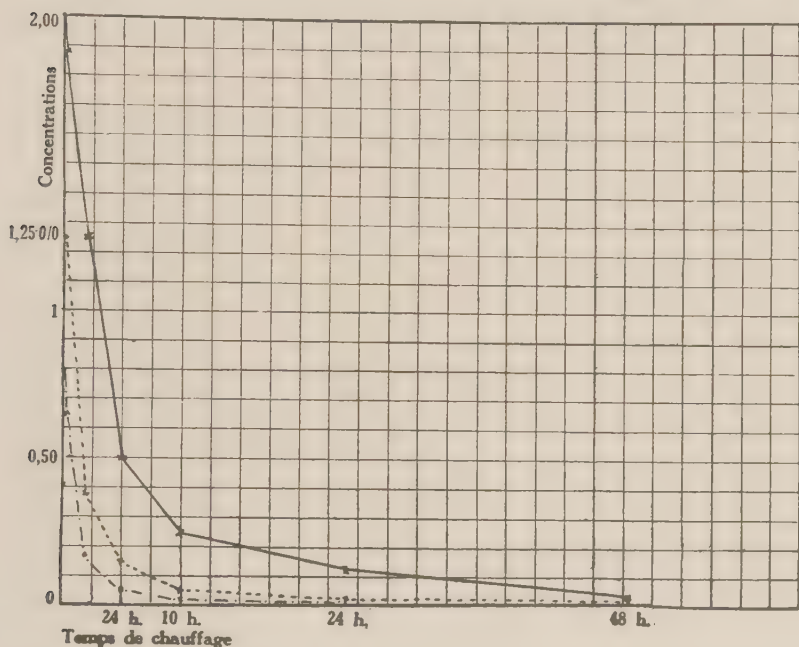
3° Stérilisées pendant 15 minutes à 120°, ces solutions deviennent légèrement plus toxiques. Cependant les doses toxiques et critiques sont peu différentes des précédentes et les courbes représentatives de la croissance ne présentent qu'un léger décalage par rapport aux courbes correspondantes des solutions non chauffées. Les indices de toxicité restent compris entre 1 et 1.33, de sorte que nous pouvons dire qu'un chauffage de 15 minutes à l'autoclave ne modifie que faiblement la composition des solutions de chlorhydrate de cocaïne.

4° Si l'action de la chaleur est prolongée au delà de 15 minutes, la toxicité croît de façon considérable, mais cet accroissement n'est pas parallèle à l'augmentation du temps de chauffage. L'accroissement de la toxicité, très rapide pendant les premières heures de la stérilisation, devient de plus en plus lent à mesure que l'action de la chaleur se poursuit.

5° D'autre part, la toxicité des solutions de chlorhydrate de cocaïne non chauffée diminue proportionnellement avec la dilution et les courbes représentatives sont presque rectilignes. Il en est encore sensiblement de même pour les solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées seulement 15 minutes à 120°. Mais si le

temps de chauffage augmente, les courbes représentatives s'incurvent de plus en plus et tendent à se rapprocher d'une hyperbole.

6° A partir d'une dilution suffisante, les solutions de chlorhydrate de cocaïne ne retardent plus de façon sensible la croissance des racines de lupin. Le titre de cette dilution limite diminue d'abord progressivement avec les premières heures de chauff-



Courbe N° 10

Variations des doses toxiques et critiques en fonction du temps de chauffage des solutions de chlorhydrate de cocaïne

- Doses toxiques.
- - - Doses critiques.
- . - . Concentrations 50 %.

fage, mais il atteint assez vite une limite qui ne sera plus dépassée. Pour toutes les solutions chauffées pendant un temps égal ou supérieur à 5 heures cette limite d'influence est représentée par un milieu contenant 0.0005 % de chlorhydrate de cocaïne.

7° Enfin les courbes ci-dessus obtenues en portant en fonction de la durée du chauffage soit les doses toxiques, soit les doses critiques, soit enfin les concentrations qui permettent des pourcentages de croissance de 50 % montrent bien que l'augmentation de la toxicité des solutions de chlorhydrate de cocaïne, sous l'influence de la chaleur, est bien loin d'être proportionnelle à l'augmentation du chauffage.

Il est intéressant de rapprocher les conclusions précédentes de celles qui ont été formulées par différents auteurs.

Après avoir donné lieu à de nombreuses discussions, l'altération des solutions de chlorhydrate de cocaïne, sous l'influence de la stérilisation à l'autoclave, paraît maintenant bien établie. Pour un chauffage exécuté dans les conditions habituelles, cette altération est assez faible et les différentes techniques utilisées (méthodes physiques, chimiques ou pharmacologiques) conduisent à des résultats assez proches les uns des autres. La proportion d'alcaloïde détruite ne dépasserait pas, par exemple 5 % d'après DUFFOUR (), 1,66 % d'après LESURE (99) et 2,30 % d'après MOSSLER (141).

Plus récemment, J. RÉGNIER, A. LIOT et R. DAVID (171) d'une part et, R. DIETZEL et O. STEEGER (44) de l'autre, ont repris l'étude de cette question.

Après avoir rappelé les principaux travaux relatifs à l'influence de la chaleur sur les préparations de chlorhydrate de cocaïne, J. RÉGNIER, A. LIOT et R. DAVID, en 1933, ont évalué les altérations de cet alcaloïde en solution en mesurant les anesthésies produites sur la cornée du lapin. Leurs conclusions sont les suivantes :

La baisse du pouvoir anesthésique résultant de la stérilisation d'une solution de chlorhydrate de cocaïne à 1 % est relativement faible. La diminution ne dépasse pas 10 % pour un chauffage de 15 minutes à 120°, elle est de 2 % pour un chauffage de 15 minutes à 110°, elle n'est pas perceptible pour un chauffage à 100°.

R. DIETZEL et O. STEEGER en utilisant uniquement des méthodes physiques (mesures du pH, mesure de la conductivité, étude des spectres d'absorption dans l'ultra-violet) arrivent à des conclusions analogues. L'étude de la courbe de saponification méthylique du chlorhydrate de cocaïne en fonction de la durée de stérilisation leur montre que « la saponification commence relativement vite et descend à un minimum pour remonter de nouveau fortement ». Ceci est dû au fait que le sel pur présente un pH de 4.79 tandis que le pH correspondant au minimum d'altération est égal à 3.10. Pour une température de 98°, on constate que la proportion de cocaïne décomposée atteint, après une heure de stérilisation, 5 %, après deux heures, 10 %, après 10 heures, 15 % et qu'elle est pratiquement totale après quatre-vingts heures de chauffage.

Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec les observations de ces auteurs. Sans doute nous ne pouvons pas comparer d'une façon rigoureuse des accroissements de toxicité avec des pourcentages de destruction du chlorhydrate de cocaïne calculés au moyen de méthodes physiques, chimiques, ou pharmacologiques, il n'en reste pas moins vrai que notre technique nous a permis de montrer qu'un chauffage de 15 minutes à 120° ne modifie que faiblement les propriétés des solutions de chlorhydrate de cocaïne et que la décomposition de ce sel n'est pas encore complète malgré un chauffage de 48 heures à 120°.

SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE STÉRILISÉES ET CONSERVÉES A L'OBSCURITE

Nous avons voulu rechercher si les altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne, sous l'influence d'une conservation assez prolongée, altérations signalées par J. RÉGNIER et ses collaborateurs (170-171), pouvaient être facilement décelées à l'aide de notre technique phytopharmacologique.

A cet effet, nous avons préparé une série de solutions de chlorhydrate de cocaïne dans l'eau distillée à des concentrations comprises entre 1 % et 0.01 %. Ces solutions réparties dans des ampoules de verre blanc ordinaire de 10 cc., ont été stérilisées pendant 15 minutes à 120° à l'autoclave dans les conditions habituelles. Nous les avons laissées vieillir à l'obscurité et à la température du laboratoire et nous les avons essayées après des durées variables de conservation. Enfin nous avons terminé nos essais en étudiant la toxicité d'une solution de chlorhydrate de cocaïne stérilisée et conservée depuis 10 ans.

Solutions de chlorhydrate de cocaïne stérilisées à 120° et conservées pendant 6 mois

Notre premier essai, effectué avec des ampoules conservées depuis 6 mois, a été conduit de la façon habituelle. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant dans lequel nous indiquons le titre et la concentration en ions H des solutions stériles, la concentration et le pH des milieux de culture et les coefficients de croissance correspondants.

Les allongements observés sont plus faibles que lorsqu'on utilise des solutions de même titre aussitôt après leur stérilisation. Les pourcentages de croissance n'atteignent que 30 % dans les milieux à 0,50 % et 50 % dans les milieux à 0,375 %.

Enfin les racines des plantes placées dans les solutions d'alcaloïde ne se différencient pas de celles des témoins aussi bien au point de vue de leur aspect morphologique que de leur structure anatomique.

TABEAU XVI
SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAINE STÉRILISÉES ET CONSERVÉES 6 MOIS

TEMOIN : LONGUEUR INITIALE : 25,10 m/m ACCROISSEMENT DE 0 A 24 HEURES : 16,00 m/m
 DE 24 A 48 HEURES : 15,40 m/m

Concentra- tions des solutions primitives	pH avant stéri- lisation	pH Après six mois	Concentra- tions des milieux de culture	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures	
						Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages
1,00	3,90	3,30	0,50	3,70	24,50	5,20	32,50	3,90	25,00	9,10	29,00
0,75	3,90	3,40	0,375	3,90	24,90	8,20	51,00	6,60	42,00	14,80	47,00
0,50	4,00	3,40	0,25	3,90	24,80	7,40	46,00	10,00	65,00	17,80	56,0
0,25	4,20	3,50	0,125	4,00	24,80	7,20	45,00	8,80	57,00	16,00	50,0
0,10	4,30	3,70	0,05	4,20	24,70	9,60	60,00	10,20	66,00	19,80	63,0
0,075	4,30	3,90	0,0375	4,20	24,60	12,20	76,00	10,40	67,50	22,60	72,0
0,05	4,30	3,90	0,025	4,30	24,70	11,60	72,00	15,20	98,00	26,80	85,00
0,025	4,50	4,00	0,0125	4,30	24,90	11,10	69,00	12,80	83,00	23,90	76,00
0,01	4,60	4,30	0,005	4,30	25,20	11,40	70,00	13,40	86,00	24,80	80,00

Solutions de chlorhydrate de cocaïne stérilisées à 120° et conservées pendant 14 mois

Nous avons ensuite essayé les mêmes solutions après une conservation de 14 mois.

Comme l'acidité des solutions avait encore légèrement augmenté sous l'influence du vieillissement, nous avons dû, après addition de la solution de SHIVE, ajouter une légère quantité de potasse N aux milieux les plus concentrés de façon à amener leur réaction à un pH plus favorable. Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Ces nouvelles solutions se sont montrées légèrement plus toxiques que les précédentes. Dès le premier jour, la croissance des racines, dans les milieux à 0,50 % de chlorhydrate de cocaïne, ne représente que 28 % de la croissance d'étalon.

Cependant, nous n'avons pas davantage constaté, tant au point de vue morphologique qu'au point de vue anatomique, de différences notables d'aspect et de structure avec les racines de la solution témoin.

Solutions de chlorhydrate de cocaïne stérilisées à 120° et conservées pendant 10 ans

Enfin nous avons terminé cette série d'essais en étudiant la toxicité d'une solution de chlorhydrate de cocaïne à 1 % âgée de 10 ans, mise à notre disposition par M. J. RÉGNIER. Cette solution avait été préparée le 3 février 1925 et stérilisée 15 minutes à l'autoclave à 120°. Elle avait été conservée à l'obscurité dans deux flacons de verre blanc fermés à l'aide de bouchons émeris. Le 23 mai 1935, après plus de 10 ans de conservation, cette solution présentait une déviation polarimétrique de $-1^{\circ}10'$ (tube de 20 cm.) et un pH de 3.50 (bleu de bromophénol de la gamme de CLARK et LUBBS). Cette même solution, au moment de sa préparation, présentait une déviation polarimétrique de $-1^{\circ}27'$ et un pH de 4.00. Le vieillissement a provoqué une diminution importante du pouvoir rotatoire et une acidification assez faible, beaucoup moins marquée que celle qui avait été observée, dans des conditions analogues, par J. RÉGNIER, A. LIOT et R. DAVID, avec la même solution conservée en ampoules. Il est vraisemblable que cette différence doit être attribuée à l'alcalinité du verre des flacons.

TABLEAU XVII
SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE STÉRILISÉES ET CONSERVÉES 14 MOIS

TEMPOIN LONGUEUR INITIALE : 26,00 m/m ACCROISSEMENT de 0 A 24 HEURES : 23,50 m/m
DE 24 A 48 HEURES : 26,50 m/m

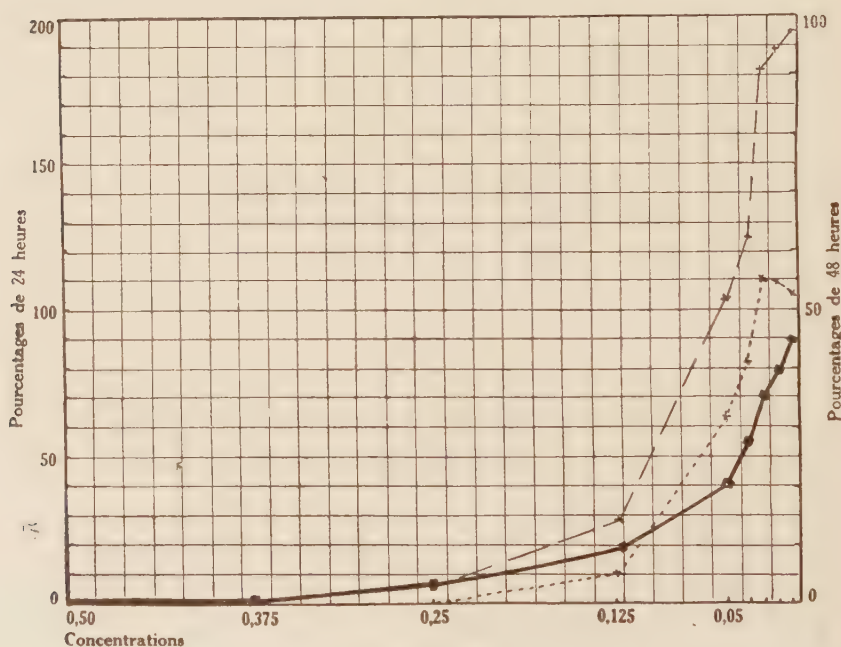
Concentra- tions des solutions primitives	pH avant stérilisa- tion	pH après 14 mois	Concentra- tions des milieux de culture	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures	
						Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages
1,00	3,90	3,20	0,50	4,30	26,30	6,70	28,10	6,00	22,00	12,70	25,40
0,75	3,90	3,30	0,375	4,00	26,40	8,90	34,00	7,40	28,00	16,30	32,60
0,50	4,00	3,30	0,25	4,60	26,50	11,90	50,40	11,10	41,00	23,00	46,00
0,25	4,20	3,30	0,125	4,10	26,10	12,70	53,00	13,40	50,50	26,10	52,20
0,10	4,30	3,60	0,05	4,00	26,00	14,30	60,50	11,60	43,70	25,90	51,80
0,075	4,30	3,90	0,0375	4,10	26,00	13,70	58,00	12,50	47,00	26,20	52,40
0,05	4,50	4,00	0,025	4,20	26,00	14,90	63,00	10,50	39,00	25,40	51,00
0,01	4,60	4,00	0,005	4,20	26,00	15,50	65,60	18,10	68,00	33,60	67,20

TABLEAU XVIII
SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAINE STÉRILISÉES ET CONSERVÉES 10 ANS

TEMOIN : LONGUEUR INITIALE : 23,40 m/m										
ACCROISSEMENT MOYEN : 0 A 24 HEURES : 13,20 m/m										
24 A 48 HEURES : 14,40 m/m										
Concentra- tions des solutions primitives	pH des solutions primitives	Concentra- tions des milieux de culture	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures	
					Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages
1,00	3,50	0,50	3,70	23,40	0	0	0	0	0	0
0,75	3,60	0,375	3,80	23,20	0	0	0	0	0	0
0,50	3,60	0,25	3,90	23,30	0,70	5,30	0	0	0,70	2,50
0,25	3,60	0,125	3,90	23,20	2,40	18,10	1,50	10,40	3,90	14,00
0,10	3,70	0,05	4,10	23,30	5,30	40,00	9,10	63,00	14,40	52,00
0,075	3,80	0,0375	4,10	23,40	7,20	54,00	11,70	81,20	18,90	68,00
0,05	3,90	0,025	4,10	24,10	9,40	71,00	16,10	111,80	25,50	92,00
0,025	4,20	0,0125	4,30	24,00	10,50	79,50	15,80	109,60	26,30	95,00
0,01	4,60	0,005	4,30	23,90	11,90	90,00	15,20	105,00	27,10	97,00
0,0075	4,60	0,00375	4,30	23,30	11,30	85,00	14,20	100,00	25,50	92,00
0,005	4,70	0,0025	4,30	23,40	14,10	107,00	17,30	121,00	31,40	110,00
0,0025	4,70	0,00125	4,30	23,40	12,80	96,90	14,40	100,00	27,20	98,00
0,001	4,70	0,0005	4,30	23,40	13,60	102,00	16,80	116,00	30,40	106,00

A partir de cette solution à 1 %, nous avons préparé, à l'aide de dilutions convenables avec de l'eau distillée et la solution de SHIVE, une série de liquides de culture dont les teneurs en alcaloïde variaient de 0.50 % à 0.0005 %. Nous avons ensuite déterminé l'action de ces mélanges sur la croissance des racines de lupin en opérant de la façon habituelle. Le tableau suivant indique les résultats ainsi obtenus.

Tandis qu'aucune racine ne résistait dans les milieux à 0.50 et 0.375 % et que les jeunes pousses ne tardaient pas à mourir dans la solution à 0.25 % pendant la deuxième journée de l'épreuve, la toxicité des solutions diminuait ensuite progressivement comme le montre le graphique suivant :



Courbe N° 11

Solutions de chlorhydrate de cocaïne stérilisées et conservées 10 ans :

— Pourcentages de 0 à 24 heures.
 - - - - - — 24 à 48 heures.
 — — — — — 0 à 48 heures.

Les courbes ainsi obtenues présentent une forme incurvée, en particulier la courbe de 0 à 48 heures rappelle celle des solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées plusieurs heures, et on peut y distinguer une zone de grosse toxicité s'étendant de 0,375 % à 0,125 %. Enfin on observe avec les solutions diluées une accélération faible mais régulière de la croissance au cours du deuxième jour de l'épreuve.

Comme d'ordinaire, les racines très intoxiquées étaient blanches et ramollies. Ce phénomène s'observait dès la 24^e heure pour les solutions à 0.50 et 0.375 % et seulement après 48 heures de culture pour la solution à 0.25 %.

L'étude anatomique des racines permettait de suivre l'intoxication jusqu'à de plus faibles dilutions. Si le bois primaire avait à peu près atteint, dans toutes les coupes, son développement normal, le bois secondaire subissait dès 0.50 % un retard sensible dans sa différenciation; l'assise génératrice n'était différenciée qu'à partir des solutions à 0.125 % et les radicules n'atteignaient leur croissance normale qu'à partir de cette même dilution.

Comparaison des résultats obtenus

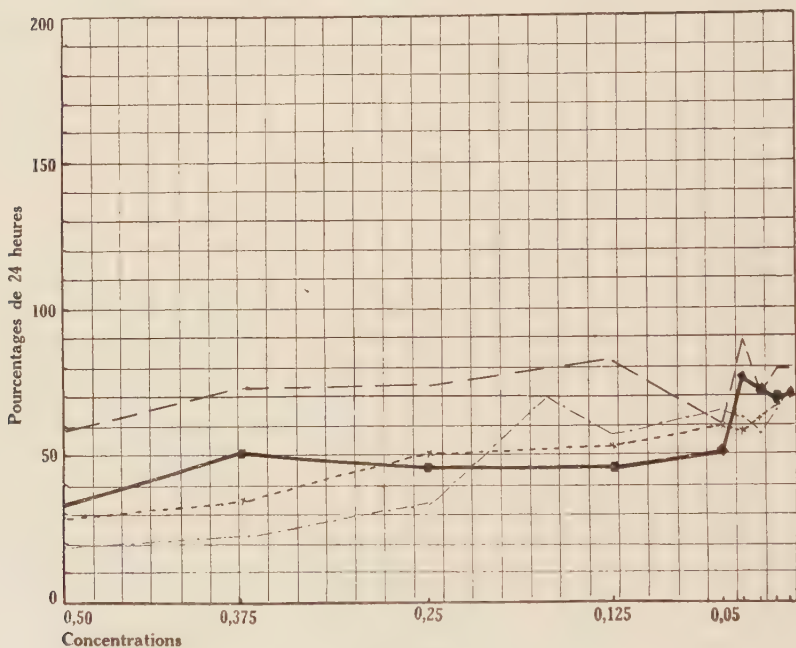
L'examen des chiffres précédents montre que l'acidification des solutions préparées par nous s'est poursuivie pendant la conservation. Les pH des solutions stérilisées 15 minutes à 120° et conservées pendant six ou quatorze mois sont, en général, un peu plus acides que les pH des solutions de même titre simplement chauffées pendant 15 minutes à 120°. Les préparations conservées pendant quatorze mois sont un peu plus acides que les solutions correspondantes âgées de six mois seulement, mais elles sont encore plus alcalines que des solutions semblables maintenues à l'autoclave pendant 2 heures à 120°.

Rappelons que cette acidification des solutions de chlorhydrate de cocaïne avait été déjà signalée par J. RÉGNIER, A. LIOT et R. DAVID. Les chiffres trouvés dans nos essais sont assez voisins des résultats rapportés par ces auteurs. En effet, d'après ces derniers, une solution de chlorhydrate de cocaïne purifié à 1 % stérilisée 15 minutes à 120° présente, après 90 jours de conservation, un pH de 3,40 et après un vieillissement de 20 mois un pH compris entre 3,10 et 3,20. Or, nous trouvons pour une solution à 1 % de chlorhydrate de cocaïne ordinaire stérilisée dans les mêmes conditions et conservée pendant 6 et 14 mois des pH successifs de 3,30 et 3,20. La solution de chlorhydrate de cocaïne conservée depuis plus de 10 ans possède encore un pH relativement élevé, mais il est vraisemblable que cette anomalie est due à une légère alcalinité du verre des flacons employés.

La comparaison des pourcentages et des courbes permet de tirer des conclusions plus précises. Les solutions conservées pendant 6 et 14 mois sont plus toxiques que les solutions simplement stérilisées 15 minutes à 120°, mais moins nocives que les préparations chauffées 2 heures à cette température. De plus, l'action retardatrice augmente légèrement avec la durée de conservation.

Les différences de toxicité sont mises en évidence par l'exa-

men des courbes suivantes qui traduisent les variations des coefficients de croissance en fonction des concentrations employées. Dans ces graphiques sont indiquées à la fois les courbes correspondant aux solutions récentes chauffées 15 minutes et 2 heures à 120° et les courbes correspondant aux solutions stérilisées 15 minutes et âgées de 6 et de 14 mois. Le premier graphique traduit les croissances de 0 à 24 heures et le second correspond à la période de 24 à 48 heures.



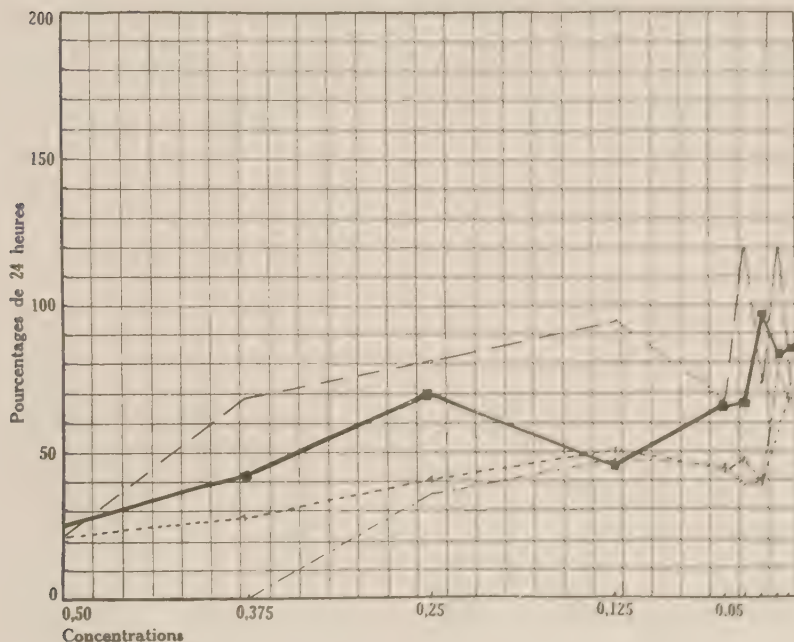
Courbe N° 12

Solutions de chlorhydrate de cocaïne stérilisées et conservées 6 et 14 mois :
pourcentages de 0 à 24 heures :

- — — — Solutions chauffées 15 minutes à 120°.
- Solutions chauffées 15 minutes à 120° et conservées 6 mois.
- - - - Solutions chauffées 15 minutes à 120° et conservées 14 mois.
- . - . Solutions chauffées 2 heures à 120°.

Aux erreurs d'expériences près, les tracés correspondant aux solutions vieilles s'intercalent toujours entre les courbes correspondant aux solutions simplement chauffées 15 minutes et 2 heures à 120°, tout en restant plus rapprochées de la seconde courbe que de la première. On peut donc dire qu'une solution de chlorhydrate de cocaïne, stérilisée 15 minutes à 120° et conservée entre 6 mois et 14 mois, est sensiblement équivalente à une solution de chlorhydrate de cocaïne de même titre récemment préparée mais chauffée à l'autoclave, à 120°, pendant une durée

comprise entre une heure et une heure trente minutes. L'altération des solutions de chlorhydrate de cocaïne sous l'influence d'une conservation ne dépassant pas une année doit être assez faible puisque, d'après les travaux de R. DIETZEL et O. STEGER, la proportion de chlorhydrate de cocaïne détruite par un chauffage de 2 heures, à 98° il est vrai, ne dépasserait pas 10 %. Nous retrouvons donc ici les conclusions formulées, par



Courbe N° 13

Solutions de chlorhydrate de cocaïne stérilisées et conservées 6 et 14 mois.

Pourcentages de 24 à 48 heures :

- — — Solutions stérilisées 15 minutes à 120° .
- — — Solutions stérilisées 15 minutes à 120° et conservées 6 mois.
- — — Solutions stérilisées 15 minutes à 120° et conservées 14 mois.
- . — . — Solutions stérilisées 2 heures à 120° .

J. REGNIER et ses collaborateurs qui, à la suite d'une étude purement pharmacologique, avaient montré qu'une solution de chlorhydrate de cocaïne à 1 % stérilisée 15 minutes à 120° avait perdu, après 20 mois de conservation, 23 % de son activité.

Enfin, une solution de chlorhydrate de cocaïne conservée pendant 10 années correspond sensiblement à une solution de même titre chauffée pendant 5 heures à 120° .

En résumé, la technique que nous avons suivie, nous permet sans peine de suivre les altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne, sous l'influence du chauffage à l'autoclave et d'une conservation plus ou moins prolongée.

La sensibilité de cette méthode, nous permet, non seulement de différencier des solutions ayant subi des temps de chauffage différents (15 minutes, 2 heures, 5 heures, 10 heures, etc.), mais de suivre les altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne pendant leur conservation à la température ordinaire.

Les résultats ainsi obtenus sont en accord avec ceux qui ont été trouvés par divers auteurs utilisant des techniques fort différentes de la nôtre : mesure de l'anesthésie (J. RÉGNIER), études physicochimiques (R. DIETZEL et O. STEEGER).

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA RÉACTION SUR LA DÉCOMPOSITION DES SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE TOXICITÉ DES PRODUITS DE DÉDOUBLEMENT

Trois facteurs principaux : chaleur, conservation et concentration des ions hydrogènes contribuent à l'altération des solutions de chlorhydrate de cocaïne. Nous avons montré, dans le chapitre précédent, que la technique phytopharmacologique que nous préconisons permet de suivre les altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne produites par le chauffage à l'autoclave ou par le vieillissement. Il nous reste à examiner si la même technique est capable de faire ressortir l'influence de la réaction sur la stabilité des solutions de chlorhydrate de cocaïne. Nous terminerons enfin, nos essais, en déterminant la toxicité, par rapport aux racines du lupin, des produits susceptibles de prendre naissance pendant la saponification de cet alcaloïde.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DES IONS H SUR LA STABILITÉ DES SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE

Les travaux de A. RIPPEL (175), de J. RÉGNIER et R. DAVID (172), et de R. DIETZEL et O. STEEGER, ont montré l'importance de la réaction au cours de la stérilisation et de la conservation des solutions de chlorhydrate de cocaïne. Nous avons repris ces

recherches en substituant aux méthodes utilisées par ces auteurs (toxicité sur le cœur de la grenouille, anesthésie de la cornée du lapin, mesures physico-chimiques), l'étude des toxicités de diverses solutions stériles sur la croissance des lupins. Nos essais ont porté, d'une part sur de simples solutions aqueuses de chlorhydrate de cocaïne amenées à des pH convenables par addition d'acide ou de base, d'autre part sur les mêmes solutions additionnées de sels tampons.

Solutions simples de chlorhydrate de cocaïne régées à des pH divers et stérilisées 15 minutes à 120°

Dans une première série de recherches, nous avons utilisé des solutions de chlorhydrate de cocaïne à 1 % dans l'eau distillée. Ces solutions étaient ajustées à des pH compris entre 1 et 7.90 par addition d'acide chlorhydrique ou de potasse normale ou déci-normale; les solutions plus acides ont été obtenues en dissolvant directement le chlorhydrate de cocaïne dans l'acide normal ou déci-normal. Le choix de cet acide et de cette base correspondait au désir de ne pas introduire d'ions nouveaux dans le milieu de culture. L'ion chlore fait partie de la molécule du chlorhydrate de cocaïne et l'ion potassium se trouve dans la solution de SHIVE. Ces solutions étaient réparties dans des ampoules de 10 cc. en verre ordinaire et stérilisées de la façon habituelle pendant 15 minutes à l'autoclave. Les solutions refroidies ont été mélangées à des volumes égaux de solution de SHIVE et ramenées ensuite vers pH 4.50 par addition de potasse ou d'acide chlorhydrique selon le cas. Les milieux de cultures ainsi obtenus ne renfermaient donc plus que 0,50 gr. % de chlorhydrate de cocaïne.

Les essais ont été conduits de la façon habituelle. On trouvera dans le tableau n° 19 les valeurs des différents pH des solutions fraîches, des solutions stériles et des liquides de culture et les pourcentages de croissance.

Si l'on excepte les premières solutions, plus acides que pH 2.10, toutes les solutions se sont acidifiées sous l'influence du chauffage à l'autoclave. L'acidification est d'autant plus marquée que les solutions primitives étaient plus alcalines et la plupart des solutions stériles présentent un pH très voisin de 3.50.

Au point de vue de leur action sur la croissance des lupins, on constate que les solutions stérilisées en milieu alcalin ou fortement acides exercent une action défavorable sur l'allongement des racines. Aucune racine n'a pu se développer dans la solution stérilisée à pH 0.00 (solution normale d'acide chlorhydrique). La croissance a été très faible le premier jour et nulle le lendemain dans la solution déci-normale; les solutions stérilisées à pH 7.50 et 7.90 se montrent de plus en plus nocives. Au contraire, toutes les solutions présentant avant la stérilisation

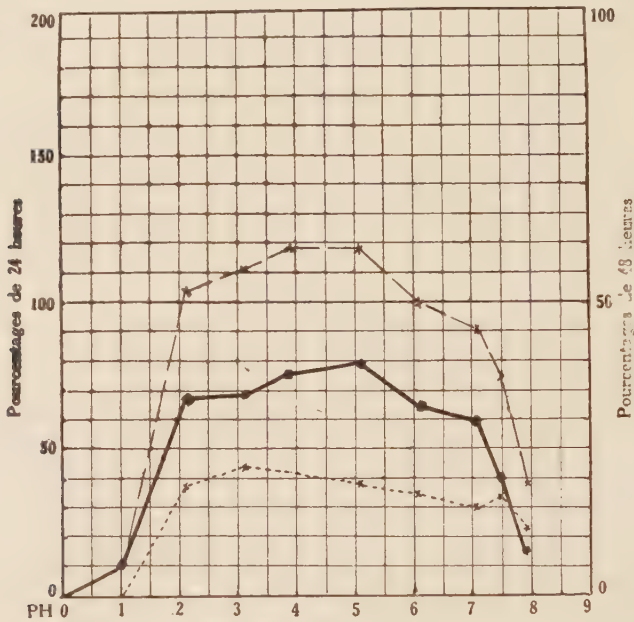
TABLEAU XIX

**SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE NON TAMPONNÉES RÉGLÉES A DIFFÉRENTS PH
ET CHAUFFÉES 15 MINUTES A 120°**

TEMOIN N° 1	LONGUEUR INITIALE	25,60 m/m	ACCROISSEMENT MOYEN DE 0 A 24 HEURES :	15,20	12,10	15,60 m/m
— 2	—	26,00 m/m	24 A 48 HEURES :	16,00	21,50	20,00 m/m
— 3	—	26,40 m/m	—	—	—	—

Solutions à 1 % de chl. de cocaïne			Solutions à 0,50 % de chl. de cocaïne						Séries N°
pH initial	pH après stérilisation	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures	
				Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages
0,00	0	4,50	25,50	0	0	0	0	0	2
1,00	1,00	4,50	25,60	1,20	10,00	0	0	1,20	3,90
1,70	1,70	4,10	26,40	4,60	29,40	5,50	27,50	10,10	28,30
2,10	2,10	5,10	25,60	10,30	67,70	5,90	36,80	16,20	52,00
3,10	2,90	5,10	25,60	10,40	67,80	7,10	44,30	17,60	56,40
3,90	3,40	4,50	25,70	11,50	75,60	6,80	42,20	18,30	58,90
5,10	3,50	4,90	25,70	12,10	79,60	6,20	38,70	18,30	58,90
6,10	3,60	4,90	25,70	9,90	65,00	5,60	35,30	15,50	50,00
7,10	3,60	4,90	25,70	9,20	60,00	4,80	30,00	14,00	44,80
7,50	3,50	4,70	25,90	4,90	40,00	7,30	34,40	12,20	36,00
7,90	3,70	4,50	26,20	1,80	14,00	5,10	23,50	6,90	20,00

un pH compris entre 2.10 et 7.10 permettent une bonne croissance des racines de lupin et la zone comprise entre pH 3.10 et pH 5.10 est particulièrement favorable. Enfin, les pourcentages de croissance ont été, en général, plus faibles pendant la deuxième journée de l'épreuve que pendant les premières 24 heures.



Courbe N° 14
Solutions de chlorhydrate de cocaïne non tamponnées
régées à différents pH et stérilisées 15 minutes à 120°.

— — — — — Pourcentages de 0 à 24 heures.
- - - - - — 24 à 48 heures.
- . - . - — 0 à 48 heures.

Les courbes suivantes obtenues en portant les pH en abscisses et les pourcentages de croissance en ordonnées traduisent les résultats ainsi obtenus. Les trois courbes ont la même allure générale et comprennent une sorte de plateau qui s'étend de pH 2.10 à pH 7.10. Par ailleurs, nous avons constaté, dans la solution d'acide chlorhydrique normal que, dès la première journée, les jeunes racines étaient devenues entièrement blanches et molles. Dans la solution à pH initial 1.00 elles présentaient un léger brunissement au niveau du collet sans que les racines aient perdu leur turgescence. Ces taches brunes s'étendaient presque sur 20 m/m. sous le collet des racines des solutions stérilisées à pH 2.10 et 3.10, elles étaient plus claires dans les

solutions à pH 4,00 et 5,10. Au contraire, elles devenaient très foncées dans les solutions à pH 6,10 et 7,10, le collet très brun était en même temps étranglé dans les solutions à pH 7,30 et 7,90.

Par contre, au point de vue anatomique, les anomalies étaient rares en dehors des racines des solutions à pH 0 et pH 7,90. Les coupes des solutions à pH 0 présentaient le retard le plus important: les éléments ligneux primaires étaient peu nombreux (6 à 7 par faisceau), les éléments secondaires étaient rares, l'assise génératrice n'était pas différenciée et les radicules très réduites. Le retard était moins important dans les coupes provenant des solutions à pH 7,90; le bois primaire était normal, mais le bois secondaire comptait peu d'éléments. L'assise génératrice quoique peu développée était parfaitement visible et les méristèmes radicellaires avaient leur développement normal.

En résumé, les solutions de chlorhydrate de cocaïne dans l'eau distillée portée pendant 15 minutes à 120° sont peu altérées par le chauffage, si leur pH initial est compris entre 2,10 et 7,10. Dans ces limites la croissance des jeunes racines de lupin atteint près de 70 % de celle de l'étalon de 0 à 24 heures et environ 40 % pour la deuxième journée. Dans cette zone les altérations sont particulièrement faibles pour les pH compris entre 3 et 5. Au contraire, les solutions dont le pH est supérieur à 7,50 ou inférieur à 1,70 sont fortement décomposées par le chauffage et deviennent fortement toxiques pour les racines de lupin.

Solutions simples de chlorhydrate de cocaïne régliées à des pH divers et stérilisées une heure à 120°

Nous avons recherché si la zone de pH favorables à la stérilisation des solutions de chlorhydrate de cocaïne conservait la même importance, malgré l'augmentation du temps de chauffage. Pour cela des solutions identiques aux précédentes ont été stérilisées à l'autoclave pendant une heure à 120°. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant.

L'acidification des solutions provoquée par le chauffage, ne diffère pas sensiblement de celle que nous avons observée dans le cas précédent. Seules, les solutions de pH initial 3,10 et 4,00 présentent, après une heure de chauffage un pH nettement plus faible qu'après une stérilisation de un quart d'heure. D'autre part, il semble bien qu'un pH voisin de 3,40 ou 3,50 constitue une acidité minima vers laquelle tendent les solutions plus alcalines.

Toutes ces solutions ayant été additionnées de liquide de SHIVE et amenées vers pH 4,50, le titre des milieux de culture en chlorhydrate de cocaïne est devenu comme précédemment égal à 0,50 %. Les résultats obtenus avec les racines de lupin sont parallèles aux précédents. La croissance presque nulle dans

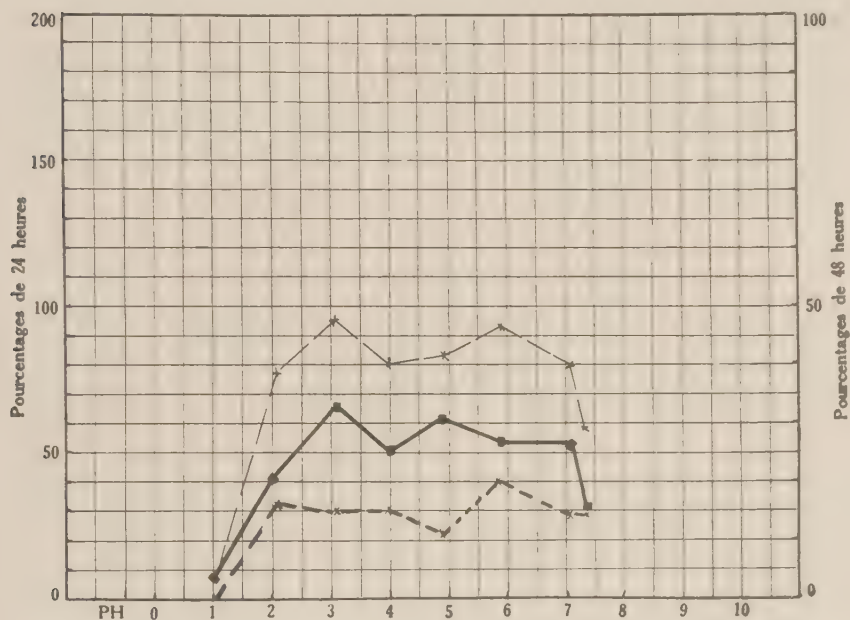
TABLEAU XX
SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE NON TAMPONNÉES RÉGLÉES A DIFFÉRENTS PH
ET CHAUFFÉES 1 HEURE A 120°

TEMOIN : LONGUEUR INITIALE : 26,40 m/m ACCROISSEMENT DE 0 A 24 HEURES : 15,60 m/m
DE 24 A 48 HEURES : 20,00 m/m

Solutions à 1 %			Solutions à 0,50 % de chlorhydrate de cocaïne							
pH initial	pH après stérilisation	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures		
				Valeur absolue	Pourcentages	Valeur absolue	Pourcentages	Valeur absolue	Pourcentages	
1,00	1,00	4,30	26,30	0,80	5,10	0	0	0,80	2,20	
2,10	2,10	4,30	26,50	6,80	43,50	6,70	33,50	13,50	37,90	
3,10	2,50	4,30	26,80	10,20	65,50	6,00	30,00	16,20	45,50	
4,00	3,30	4,30	26,80	7,90	50,00	6,10	30,50	14,00	39,30	
4,90	3,40	4,30	26,50	9,60	61,50	4,50	22,50	14,10	39,60	
5,90	3,50	4,30	26,40	8,30	53,20	8,00	40,00	16,30	46,60	
7,10	3,50	4,30	26,30	8,30	53,20	5,40	27,00	13,70	38,40	
7,30	3,50	4,30	26,40	4,30	30,70	5,60	28,00	10,40	29,20	

les solutions de pH égal à 1 a été nettement ralentie dans la solution à pH 7.30. La zone favorable à la conservation de l'anesthésique est encore comprise entre 2.10 et 7.10. D'une façon générale, les racines ont été moins intoxiquées de 0 à 24 heures que de 24 heures à 48 heures.

Les courbes correspondant à cet essai ne diffèrent pas sensiblement de celles que nous avons obtenues dans le cas précédent. Chacune de ces courbes s'inscrit à l'intérieur de la courbe



Courbe N° 15

Solutions de chlorhydrate de cocaïne non tamponnées
régées à différents pH et stérilisées 1 heure à 120° :

———— Pourcentages de 0 à 24 heures.
 - - - - - — 24 à 48 heures.
 ———— — 0 à 48 heures.

correspondante de la série antérieure, ce qui montre que l'augmentation du temps de chauffage a accéléré la décomposition de l'alcaloïde, mais les limites du plateau n'ont pratiquement pas variées.

Toutes les racines, comme dans l'expérience précédente, portaient des taches brunes plus ou moins prononcées, au niveau du collet. Faiblement colorées, ces taches s'étendaient seulement sur 10 m/m. dans la solution à pH 7.30; elles étaient très foncées sur les racines des solutions à pH 4.90, 4.00, 3.10 et 2.10. Dans la solution à pH 1.00 les racines étaient mortes, blanches

et ramollies dès le premier jour, après s'être très peu allongées; le deuxième jour l'extrémité était devenue gris-noir sur une longueur de 2 m/m.

La structure des racines des solutions à pH 1,00 et 1,70 était légèrement modifiée. Les tissus périphériques étaient normaux, le bois primaire avait presque son développement normal, mais la différenciation du bois secondaire avait été « freinée », l'assise génératrice était peu développée. Les radicules peu visibles dans la solution à pH 1,00 étaient plus apparentes dans la solution à pH 2,00. A partir des solutions à pH 2,00 ces anomalies disparaissent.

Nous pouvons donc conclure que des solutions de chlorhydrate de cocaïne non tamponnées, réglées à des pH compris entre 2,10 et 7,10 sont peu altérées par un chauffage à 120° même prolongé pendant une heure. Au contraire, des pH inférieurs à 2,10 ou supérieurs à 7,10 provoquent l'altération de ces solutions.

Solutions de chlorhydrate de cocaïne faiblement tamponnées réglées à des pH divers et stérilisées 15 minutes à 120°

Les solutions non tamponnées de chlorhydrate de cocaïne fortement acides ou simplement alcalines (pH inférieurs à 2 ou supérieurs à 7) s'altèrent rapidement, sous l'influence du chauffage à l'autoclave, avec formation de produits toxiques pour la racine de lupin.

A l'intérieur de cette zone, l'influence de la réaction initiale sur la saponification du chlorhydrate de cocaïne semble assez faible. Les solutions atteignent très rapidement un premier état d'équilibre, caractérisé par un pH voisin de 3,50 et, à partir de ce moment, la décomposition du chlorhydrate de cocaïne, à peu près équivalente dans toutes les solutions, ne semble plus dépendre que de la durée du chauffage.

En utilisant des solutions tamponnées, on pouvait espérer retarder la formation de cet état d'équilibre et rendre ainsi plus visible l'influence de la réaction initiale sur la stabilité des solutions de chlorhydrate de cocaïne.

Nous avons d'abord utilisé, comme solution tampon, une solution de phosphate acide de potassium à 2 gr. 50 par litre d'eau distillée présentant un pH égal à 4,50. Ce sel présente l'avantage de ne pas introduire d'ions nouveaux dans le liquide de culture et la concentration choisie est très voisine de la teneur du liquide de SHIVE en phosphate acide de potassium (2 gr. 45 0/00).

Le chlorhydrate de cocaïne a été dissous à raison de 1 % dans la solution de phosphate acide de potassium, et les préparations obtenues, réglées au pH choisi, compris entre 1,20 et

TABLEAU XXI

**SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE FAIBLEMENT TAMPONNÉES
RÉGLÉES A DIFFÉRENTS PH ET CHAUFFÉES 15 MINUTES à 120°**

TEMOIN N° 1	LONGUEUR INITIALE	22,70 m/m	ACCROISSEMENT DE 0 A 24 HEURES :	9,80	23,60	m/m
—	2	—	—	—	—	—
		26,00 m/m	24 A 48 HEURES :	7,80	25,60	m/m

Solutions à 1 % de chl. de cocaïne		Solutions à 0,50 % de chl. de cocaïne								Séries N ^{os}
pH initial	pH après stérilisation	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures		
				Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	
1,20	1,40	4,60	26,60	2,90	12,20	0	0	2,90	12,20	1
1,50	1,50	4,60	26,50	6,80	28,80	2,80	10,50	9,60	19,00	1
2,10	2,10	4,00	22,70	5,40	55,00	8,30	106,00	14,10	80,00	2
3,00	2,90	4,30	22,70	7,30	74,00	6,40	82,00	13,70	78,00	2
3,90	3,30	4,10	22,70	5,80	59,00	6,40	82,00	12,20	69,00	2
4,30	3,40	4,10	22,70	4,80	48,00	3,90	50,00	8,70	49,00	2
5,10	3,50	4,30	22,70	3,90	40,80	3,20	41,00	7,10	40,40	2
6,10	3,60	4,30	22,40	1,20	12,00	0	0	1,20	6,70	2
6,90	3,90	4,00	22,40	0	0	0	0	0	0	2
7,30	4,10	4,20	23,00	0	0	0	0	0	0	2
7,80	4,20	4,20	23,00	0	0	0	0	0	0	2

7,80, par addition d'acide chlorhydrique normal ou de solution normale de potasse, ont été réparties en ampoules de 10 cc. et stérilisées à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°.

Les essais de culture ont été effectués sur les solutions stériles additionnées d'un volume égal de solution de SHIVE. Les liquides ainsi obtenus, renfermant seulement 0,50 gr. % de chlorhydrate de cocaïne, étaient amenés à un pH voisin de 4,50 quand cela était nécessaire.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant dans lequel nous indiquons, à côté des pourcentages de croissance, les pH des solutions avant et après leur stérilisation.

Tandis que, comme dans le cas précédent, les solutions acides (pH inférieurs à 3,00) ne subissent du fait de la stérilisation que des modifications très faibles ou nulles de leur réaction primitive, les solutions moins acides ou alcalines s'acidifient fortement et tendent à atteindre un pH voisin de 3,50. Cependant les solutions les plus alcalines, par suite de la présence du sel tampon, ne dépassent pas pH 4,10 ou 4,20.

Les solutions stérilisées en milieu alcalin pH 7,80, 7,30 et 6,90 ont tué les jeunes racines dès le premier jour de l'épreuve. Les solutions légèrement acides ont été moins nocives. Si la croissance est encore très faible le premier jour dans la solution chauffée à pH 6,10, elle atteint 41 % dès pH 5,10 et 48 % dans la solution à pH 4,30. Enfin les solutions stérilisées à pH 3,90, 3,00 et 2,10 fournissent des pourcentages de croissance de 59 %, 74 % et 55 % le premier jour et de 82, 82 et 106 % pendant la période de 24 à 48 heures. Inversement, si l'acidité dépasse pH 2,00, la toxicité augmente avec la concentration en ions H et la croissance n'est plus que de 12 % le premier jour dans une solution à pH 1,20.

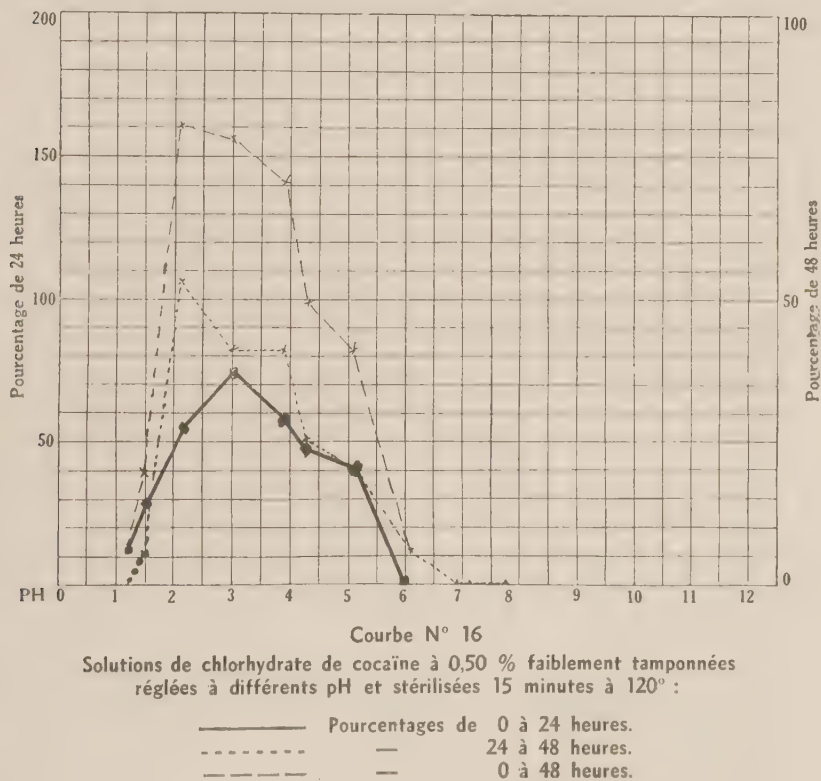
L'examen des jeunes racines nous a permis de constater que seules les racines des solutions alcalines (pH 7,80, 7,30, 6,90) et de la solution à pH 1,20 avaient perdu leur turgescence et étaient devenues blanches. Les racines qui cultivaient dans les autres solutions présentaient quelques taches brunes au niveau du collet.

L'évolution des tissus était retardée parallèlement chez les racines des solutions alcalines. Les éléments ligneux primaires et secondaires étaient d'autant moins nombreux que la solution était plus alcaline avant la stérilisation. L'assise génératrice, réduite chez les racines des solutions à pH 6,90, n'était pas encore différenciée à partir des solutions à pH 7,30. La différenciation des radicules subissait un retard identique.

Les courbes suivantes, obtenues en portant, en fonction des divers pH, les pourcentages de croissance pendant les différentes périodes de la culture montrent nettement l'influence de la réaction initiale sur la stabilité des solutions de chlorhydrate de cocaïne.

La toxicité des solutions stériles de chlorhydrate de cocaïne par rapport aux jeunes racines de lupin, reste à peu près constante lorsque le pH des solutions fraîches est compris entre 2,20 et 3,90. Si l'on s'écarte de ces limites, la toxicité s'accroît très

rapidement et le développement des racines est presque nul, dès le premier jour, pour des solutions primitivement réglées à pH 1,20 ou pH 6,10. L'augmentation de la toxicité étant en rapport avec la décomposition du chlorhydrate de cocaïne, l'examen des courbes précédentes montre qu'un pH voisin de 3,00 semble particulièrement favorable à la conservation des solutions de chlorhydrate de cocaïne. L'addition de sel tampon a donc pour effet de réduire la zone des pH favorables déterminée par les essais précédents.



Solutions de chlorhydrate de cocaïne en milieux tamponnés, utilisation des mélanges de A. Rippel

Dès 1920, A. RIPPEL (175), en utilisant principalement des milieux fortement tamponnés, avait montré l'influence de la concentration des ions H sur la conservation de l'activité des solu-

tions de chlorhydrate de cocaïne. Un peu plus tard, J. RÉGNIER et R. DAVID, en reprenant les essais de cet auteur, précisent les résultats d'abord obtenus. Nous avons, à notre tour, utilisé les solutions préconisées par A. RIPPEL, afin d'essayer de rapprocher les résultats fournis par notre méthode, des données résultant de techniques différentes.

A. RIPPEL préparait des solutions de chlorhydrate de cocaïne à 1 % réglées à différents pH par dissolution de ce sel dans des liquides divers :

a) solution déci-normale d'acide chlorhydrique pour pH 1;

b) solution déci-normale d'acide acétique pour pH 2,90;

c) mélange de 6 parties d'une solution déci-normale d'acide acétique et de 4 parties d'une solution déci-normale d'acétate de sodium pour pH 4,60;

d) mélange en proportions variables d'une solution M/15 de phosphate monosodique et d'une solution M/15 de phosphate disodique pour les pH compris entre 5,80 et 7,80. En particulier :

9 parties de phosphate monosodique et 1 partie de phosphate disodique donnent pH 5,80.

8 parties de phosphate monosodique et 2 parties de phosphate disodique donnent pH 6,30.

4 parties de phosphate monosodique et 6 parties de phosphate disodique donnent pH 6,90.

2 parties de phosphate monosodique et 8 parties de phosphate disodique donnent pH 7,30.

1 partie de phosphate monosodique et 9 parties de phosphate disodique donnent pH 7,80.

Rappelons simplement, pour faciliter la comparaison avec les résultats précédents, qu'une solution N. 10 d'acétate de sodium renferme 13,60 gr. de ce sel par litre et que les solutions M/15 de phosphate monosodique et de phosphate disodique contiennent respectivement 9,20 gr. et 23,95 gr. de sel cristallisé par litre.

Avant d'étudier l'influence de la réaction sur la stabilité des solutions de chlorhydrate de cocaïne, il importait d'abord de déterminer l'influence propre des sels de A. RIPPEL sur la croissance du lupin. Nous avons pour cela cultivé nos jeunes plantes dans les solutions de RIPPEL additionnées de leur volume de solution de Suive et réajustées vers pH 4,50 à l'aide d'acide phosphorique ou de potasse. Tandis qu'une première série d'essais comprenait des solutions fraîches, une seconde série utilisait les mêmes solutions préalablement mises en ampoules et stérilisées pendant 15 minutes à 120°. Les résultats ainsi obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

La croissance a été nulle dès le premier jour dans les solutions acétiques : solutions N/10 d'acide acétique de pH 2,90 et mélange de 6 parties d'acide acétique N/10 et de 4 parties d'acétate de sodium N/10 de pH 4,60. Ces essais l'ont donc ressortir la grande toxicité de l'acide acétique et des acétates pour les végétaux, toxicité qui, ainsi que nous l'avons indiqué dans le

TABLEAU XXII

SOLUTIONS TAMPONS DE RIPPEL SANS ADDITION DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE

TEMOIN : LONGUEUR INITIALE : 27,60. m/m ACCROISSEMENT DE 0 A 24 HEURES : 16,70. m/m
 DE 24 A 48 HEURES : 19,70. m/m

pH des solutions	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures	
			Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages
2,90	4,50	27,60	0	0	0	0	0	0
4,60	4,40	27,60	0	0	0	0	0	0
5,80	4,40	27,60	15,00	89,00	18,80	95,00	33,80	92,00
6,30	4,60	27,70	12,50	74,00	11,20	56,00	23,70	65,00
6,90	4,40	27,50	13,10	78,00	16,00	81,00	29,10	79,00
7,30	4,20	27,60	13,30	79,00	15,10	77,00	28,40	78,00
7,80	4,40	27,40	11,60	69,00	10,60	53,00	22,20	60,00

premier chapitre, avait déjà été signalée par différents auteurs : RÉVEIL, FASSENENDER et GRÉVILLIUS, BRACONNOT, COUPIN et COGGESHALL. ASO en particulier relate qu'un plant de sorgho, haut de 0.30 m. a été tué en 8 jours dans une solution à 0.50 % d'acétate de sodium.

Les solutions phosphatées fournissent, au contraire, de bons résultats. Les pourcentages de croissance pour la première journée restent compris entre 74 et 89 % pour les solutions comprises entre pH 5,80 et pH 7,30. Seule la solution à pH 7,80 donne un chiffre légèrement inférieur (69 %). Pour tenir compte du léger retard apporté par la présence des sels tampons et pour vérifier si l'activité propre au chlorhydrate de cocaïne n'était pas modifiée du fait de son association aux sels de RIPPEL, nous avons essayé l'action des solutions de chlorhydrate de cocaïne, tamponnées et non chauffées, sur les racines de lupin.

Ces solutions étaient préparées de la manière suivante : un volume convenable de chacune des solutions de RIPPEL était additionné d'un volume égal de liquide de SHIVE; le mélange était ajusté vers pH 4.50 par addition d'acide phosphorique ou de potasse selon le cas, puis on y dissolvait le chlorhydrate de cocaïne à la concentration de 0.50 %. Si, en effet, nous avions dissous le chlorhydrate de cocaïne dans la solution de RIPPEL avant de la réajuster, le sel serait resté, pendant le temps nécessaire à la préparation, en présence d'une réaction alcaline ou acide, suivant les cas et aurait subi, de ce fait, une hydrolyse appréciable.

Les allongements des racines observés dans ces conditions sont donnés dans le tableau suivant :

Comme on devait s'y attendre, les solutions acétiques ont provoqué très rapidement la mort des racines. Les pourcentages de croissance obtenus avec les solutions phosphatées ont été compris, le premier jour, entre 34 et 51 %. Ces chiffres sont nettement inférieurs à celui que nous avons obtenu avec une solution de chlorhydrate de cocaïne de même titre dans l'eau distillée (64 %). Le retard est particulièrement appréciable pour la solution de pH 7,80 qui, même sans addition de chlorhydrate de cocaïne, s'était déjà montrée plus nocive que les autres milieux phosphatés. Comme cette solution est également la plus concentrée en sels (elle est, en effet, préparée en mélangeant 9 parties d'une solution de phosphate disodique à 23.96 % et 1 partie d'une solution de phosphate monosodique à 9.20 %), il est permis d'établir un rapprochement entre l'augmentation de la concentration et l'accroissement de la toxicité.

Nous avons enfin dissous, dans chacun des mélanges de RIPPEL 1 % de chlorhydrate de cocaïne, et nous avons stérilisé les solutions ainsi obtenues, pendant 15 minutes à 120°, après les avoir réparties dans des ampoules de 10 cc. en verre ordinaire.

Comme l'avaient déjà noté J. RÉGNIER et R. DAVID, la chaleur provoque une acidification des solutions légèrement acides, neutres ou alcalines, mais cette acidification est limitée par le pouvoir tampon des solutions et les pH des solutions stériles sont bien loin d'atteindre le pH d'équilibre 3,50 noté précédemment.

Avec ces solutions stériles nous avons fait des essais de cul-

TABEAU XXIII
SOLUTIONS DE RIPPEL ADDITIONNÉES DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE ET NON CHAUFFÉES

TEMOIN LONGUEUR INITIALE : 27,70 m/m ACCROISSEMENT DE 0 A 24 HEURES : 9,20 m/m
 DE 24 A 48 HEURES : 8,10 m/m

pH des solutions tampons	Solutions à 0,50 % de chl. de cocaïne									
	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures			
			Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages		
2,90	4,20	27,70	0	0	0	0	0	0	0	
4,60	4,30	27,70	0	0	0	0	0	0	0	
5,90	4,20	27,70	5,60	31,40	5,50	28,00	11,10	30,00	30,00	
6,30	4,40	27,70	7,70	46,10	6,00	35,00	13,70	37,00	37,00	
6,90	4,20	27,70	8,50	50,80	4,80	24,00	13,30	36,00	36,00	
7,30	4,20	27,80	6,80	40,00	5,50	29,00	12,30	33,00	33,00	
7,80	4,20	27,70	5,70	34,10	2,60	13,00	8,30	22,00	22,00	

ture en opérant comme précédemment; mais aucune racine n'a pu se développer dans n'importe quel milieu et, moins de 10 heures après la mise à l'étuve, nous avons pu constater la mort des racines dont la turgescence avait disparu.

Comparaison des résultats obtenus

En résumé, nous avons étudié l'influence de la concentration des ions H sur la stabilité des solutions de chlorhydrate de cocaïne soumises à une stérilisation normale à l'autoclave. Les essais ont été effectués d'abord avec de simples solutions de chlorhydrate de cocaïne dans l'eau distillée, puis avec des solutions diversement tamponnées. Les résultats sont les suivants :

1° Les solutions de chlorhydrate de cocaïne dans l'eau distillée sont peu altérées par un chauffage de 15 minutes à 120°, si leur réaction initiale est comprise entre pH 2,00 et pH 7,00; elles sont, au contraire, d'autant plus altérées que leur pH initial s'éloigne davantage de ces limites. Si l'action de la chaleur est prolongée pendant une heure, les limites de la zone favorable ne sont pas modifiées et le léger accroissement de toxicité constaté semble simplement dû à l'augmentation du temps de chauffage.

2° Si les solutions de chlorhydrate de cocaïne sont faiblement tamponnées (par addition de phosphate monopotassique à 2,50 %), les préparations fortement acides (pH 1,20 et au-dessous) ou voisines de la neutralité sont très altérées par le chauffage. Seules les solutions réglées à des pH compris entre 2,20 et 3,90 supportent sans grand dommage une stérilisation normale. Un pH égal à 3 semble correspondre au minimum d'altération.

3° Si l'on fait usage d'un système fortement tamponné (mélanges de RIPPEL), les solutions de chlorhydrate de cocaïne neutres ou légèrement alcalines deviennent très toxiques et, à la concentration de 0,50 %, tuent les racines de lupin sans permettre de saisir aucune différence d'action entre des solutions préalablement réglées à des pH compris entre 6,00 et 7,80. Les solutions à base d'acétate de sodium et d'acide acétique sont inutilisables, ces composés étant très toxiques pour les jeunes racines.

4° Il est curieux de constater que les solutions dont la toxicité n'a pas été augmentée présentaient un pH initial voisin de 3 ou de 4 ou atteignaient facilement cette concentration en ions H pendant la stérilisation. Enfin, l'augmentation de la toxicité est d'autant plus importante que le milieu s'oppose davantage à cette modification de la réaction initiale.

Il est intéressant de voir que ces résultats, obtenus par une technique phytopharmacologique, sont exactement comparables à ceux qui avaient été trouvés par J. RÉGNIER et R. DAVID en mesurant les anesthésies produites sur l'animal, ou par R. DIETZEL et O. STEEGER en employant des méthodes physico-chimiques.

J. RÉGNIER et R. DAVID avaient été amenés, à la suite de leurs

travaux antérieurs, « à tenter de préparer des solutions pouvant être stérilisées et conservées pendant longtemps, tout en présentant une concentration en ions H favorable à l'emploi clinique ». Ces auteurs avaient constaté déjà que la concentration en ions H des solutions de chlorhydrate de cocaïne exerce une grande influence sur l'activité physiologique de ces solutions. Ils avaient mis en évidence, d'une part, que les solutions aqueuses de chlorhydrate de cocaïne légèrement alcalinisées présentent une forte augmentation de leur pouvoir anesthésique; et d'autre part, qu'il se produit, sous l'influence d'une conservation prolongée, une acidification de la solution dans l'eau distillée, acidification qui accompagne la destruction de l'alcaloïde.

Pour obtenir des préparations susceptibles d'un emploi clinique, J. RÉGNIER et R. DAVID ont donc réglé à des pH déterminés des solutions aqueuses de chlorhydrate de cocaïne, en y dissolvant des sels possédant un pouvoir tampon plus ou moins élevé, et mesuré, après stérilisation, l'activité anesthésique de ces solutions sur la cornée du lapin.

D'une part, des solutions fortement tamponnées et réglées à des pH assez nettement alcalins, voisins de la neutralité ou légèrement acides ont été obtenues en utilisant deux systèmes tampons (carbonate de sodium et phosphate monosodique ou phosphate mono-sodique et phosphate disodique); d'autre part, des solutions faiblement tamponnées ont été préparées en employant soit le carbonate de calcium soit le carbonate d'ammonium.

Les auteurs sont arrivés aux conclusions suivantes :

« 1° Au cours de la stérilisation à l'autoclave, les solutions de chlorhydrate de cocaïne en milieux fortement tamponnés à base de carbonate ou de phosphate de sodium, perdent, quand elles sont alcalines ou neutres, la totalité de leur pouvoir anesthésique, et, quand elles sont plus acides, la plus grande partie de cette activité.

2° Les solutions de chlorhydrate de cocaïne en milieux faiblement tamponnés, à base de carbonate de sodium ou de carbonate de magnésium, de réaction voisine de la neutralité, supportent relativement bien la stérilisation à l'autoclave.

3° Les solutions de chlorhydrate de cocaïne, ayant conservé une plus ou moins grande partie de leur activité physiologique, tendent à s'équilibrer vers une réaction acide assez nettement déterminée (au voisinage de pH 3,80). Il semble même que la baisse du pouvoir anesthésique, résultant de la stérilisation, soit d'autant plus importante que le milieu s'oppose davantage à cette modification de la réaction initiale. »

L'année suivante, ces auteurs reprennent les travaux de A. RIPPEL :

RIPPEL, en dissolvant le chlorhydrate de cocaïne dans les solutions tampons que nous avons indiquées précédemment et en déterminant, avant et après chauffage, la toxicité des préparations ainsi obtenues sur le cœur de la grenouille avait été amené à conclure que la cocaïne résiste à un chauffage de une heure à 100° quand le pH de la solution est compris entre 1 et 5,80.

J. RÉGNIER et R. DAVID, en substituant à la technique employée par RIPPEL la mesure des anesthésies produites sur la cornée du lapin, montrèrent que la zone des pH favorables à la conservation des solutions de chlorhydrate de cocaïne, était beaucoup plus limitée :

« Les solutions de chlorhydrate de cocaïne ne résistent au chauffage et au vieillissement que lorsque leur pH initial est compris entre des limites assez étroites voisines de 4,00 ou lorsque cette concentration en ions H est atteinte facilement pendant la stérilisation. La zone de conservation, indiquée par RIPPEL (1,00 à 5,80) nous paraît donc être trop étendue. »

Il n'est pas difficile de voir combien ces résultats, fournis par des méthodes d'essais sur l'animal, concordent avec les conclusions de nos recherches. A la diminution du pouvoir anesthésique, constatée par J. RÉGNIER et R. DAVID, correspond un accroissement parallèle de la toxicité des solutions vis-à-vis des racines du lupin.

Enfin nos résultats sont également très voisins de ceux qui ont été obtenus par R. DIETZEL et O. STEEGER en utilisant des techniques physico-chimiques.

Ces auteurs ont évalué, en fonction de la température et de la concentration en ions H, les vitesses de saponification du chlorhydrate de cocaïne pour les deux processus qui conduisent l'un à la libération d'acide benzoïque, l'autre à la formation d'alcool méthylique. Les mesures furent faites à des températures diverses 18, 40, 61, 78 et 98 degrés, et pour des pH variés : 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11. Les différents pH étaient obtenus par simple addition de lessive de soude ou d'acide chlorhydrique sans intervention de sels tampons. Dans ces conditions, et pour un chauffage d'une heure à 98° par exemple, on constate que les quantités d'alcool méthylique et d'acide benzoïque libérées, nulles pour des pH compris entre 3 et 4 et encore très faibles entre pH 2 et pH 5, s'accroissent très rapidement lorsqu'on s'écarte de cette zone favorable. Le minimum d'altération correspond à pH 3,10, chiffre très voisin de celui que nous avons trouvé.

INFLUENCE DES PRODUITS DE DECOMPOSITION DU CHLORHYDRATE DE COCAÏNE SUR LA CROISSANCE DES LUPINS

L'altération des solutions de chlorhydrate de cocaïne, sous l'influence du chauffage ou de la conservation, se traduit par une augmentation de la toxicité de ces solutions pour les jeunes ra-

cines de lupin. Quels sont, parmi les produits susceptibles de se former au cours de la décomposition du chlorhydrate de cocaïne, les composés responsables de cet accroissement de la toxicité?

La destruction du chlorhydrate de cocaïne en solution aqueuse s'effectue par des processus d'hydrolyse suivis de phénomènes de saponification. Le chlorhydrate de cocaïne est d'abord hydrolysé avec mise en liberté d'acide chlorhydrique, acide fort, et de base cocaïne, base faible, peu ionisée, d'où forte diminution du pH de la solution primitive. La base cocaïne ou méthylbenzoylecgonine est ensuite saponifiée suivant deux processus différents :

a) mise en liberté d'alcool méthylique et formation de benzoylecgonine;

b) mise en liberté d'acide benzoïque et formation de méthylecgonine.

Enfin une saponification plus complète provoque le dédoublement de la benzoylecgonine et de la méthylecgonine avec mise en liberté d'acide benzoïque, d'alcool méthylique et d'ecgonine et formation accessoire de benzoate de méthyle.

Parmi les différents auteurs qui ont étudié les altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne, EINHORN, DUFFOUR et RIBAUT, MERCK, SOLLMANN (190) et J. RÉGNIER ont caractérisé dans les produits de dédoublement l'alcool méthylique ou la benzoylecgonine. La mise en liberté d'acide benzoïque et d'alcool méthylique a, d'autre part, été signalée par DUFFOUR et RIBAUT, LESURE et L. ROY (178).

R. DIETZEL et O. STEEGER, en 1933, montrèrent d'abord que l'ecgonine constitue un terme stable dans l'échelle des produits de dédoublement de la cocaïne et que, par conséquent, les changements qui se produisent dans les solutions de cet alcaloïde doivent être limités à des processus de saponification. Par contre les solutions de chlorhydrate de cocaïne n'atteignent leur état d'équilibre que lorsque pratiquement la totalité du sel a été décomposée.

L'étude des constantes de dissociation montre également à ces auteurs que, dans la désintégration de la cocaïne, les deux modes de saponification ne sont pas équivalents. La mise en liberté de l'alcool méthylique est accompagnée d'une acidification nette de la solution tandis que la formation d'acide benzoïque et de méthylecgonine, en dehors de la petite augmentation d'ions H provenant de l'acide benzoïque, ne modifie que faiblement la réaction de la solution. Enfin, quand la saponification est complète, il ne reste plus dans la solution que de l'ecgonine, de l'alcool méthylique et de l'acide benzoïque.

En résumé, les produits susceptibles de prendre naissance au cours de la stérilisation ou de la conservation des solutions de chlorhydrate de cocaïne sont les suivants : benzoylecgonine, méthylecgonine, ecgonine, alcool méthylique, acide benzoïque et benzoate de méthyle provenant d'une réaction secondaire entre l'acide benzoïque et l'alcool méthylique libérés. Nous avons donc étudié la toxicité des principaux de ces composés sur les racines de lupin en utilisant la technique habituelle. A vrai dire, D. I. MACHT avait déjà recherché l'influence de l'alcool méthyli-

que, de la benzoylecgonine, du chlorhydrate d'ecgonine, du benzoate de sodium et du benzoate de méthyle sur la croissance des lupins. Nous avons, cependant, jugé bon de reprendre ces essais. La comparaison de nos résultats avec ceux qui avaient été obtenus par notre prédécesseur nous renseignera d'abord sur la précision de la méthode. L'étude des modifications anatomiques survenues pendant la croissance pourra conduire à des observations intéressantes. Enfin, tandis que D. I. MACHT avait trouvé dans ses essais, que le chlorhydrate d'ecgonine était plus toxique que la benzoylecgonine, W. SIGMUND en utilisant une technique un peu différente avait trouvé le contraire. Il semblait donc utile de rechercher la cause de ce différend.

Influence de l'alcool méthylique sur la croissance des lupins

L'un des premiers produits auxquels donne naissance la saponification de la base cocaïne est l'alcool méthylique. Nous avons utilisé dans nos recherches un alcool méthylique pur à 99°.

Nous avons préparé, à l'aide de ce composé, une série de solutions aqueuses que nous avons additionnées de leur volume de liquide de SHIVE pour obtenir des milieux de culture dont les concentrations en alcool allaient de 7.50 à 0.025 %. La réaction de ces milieux était identique à la réaction du milieu-témoin (pH 4.50). L'expérience a été conduite de la façon habituelle et les résultats sont donnés dans le tableau suivant, dans lequel nous indiquons en même temps les pourcentages de croissance trouvés par MACHT dans des expériences analogues.

L'alcool méthylique se montre donc très peu nocif pour les jeunes racines. Seule une concentration de 7.50 % empêche tout allongement des racines. Si la croissance est encore très faible le premier jour et nulle de 24 à 48 heures dans une solution à 5 %, elle atteint déjà 70 % pour la première journée dans une solution à 1.50 % et dès 0.50 % les racines ne sont plus retardées. Ces résultats sont, en général, assez voisins de ceux qui sont rapportés par D. I. MACHT. Cependant la dose minima-toxique trouvée dans nos essais est supérieure à celle qui avait été indiquée par cet auteur, et nous n'avons pas noté de stimulation de la croissance sous l'influence des faibles dilutions. L'ascension régulière des courbes représentatives des pourcentages de croissance traduit la diminution rapide de la toxicité avec la dilution et nous relierons simplement comme points caractéristiques les concentrations suivantes : dose toxique 7.50 %, dose critique 5 %, dose permettant un pourcentage de croissance de 50 %, 1.80 %, limite d'influence 0.50 %.

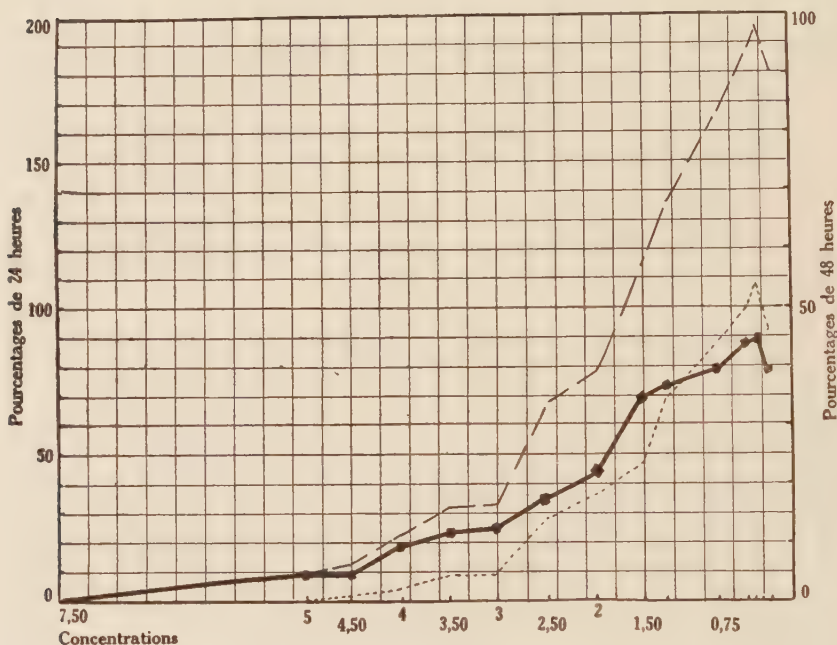
Les jeunes racines étaient très particulières; non seulement leur extrémité était brune, mais dans les solutions concentrées ces

SOLUTIONS D'ALCOOL MÉTHYLIQUE

TEMPOIN N° 1 : LONGUEUR INITIALE : 22,50 m/m ACCROISSEMENT DE 0 A 24 HEURES : 13,50 15,60 m/m
 — N° 2 : LONGUEUR INITIALE : 24,50 m/m DE 24 A 48 HEURES : 17,30 18,80 m/m

Concentrations des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures		Résultats de MACHT		Séries N°s
		Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Concen- tration	Pourcen- tages	
7,50	22,30	0	0	0	0	0	0	4,80	0	1
5,00	22,30	1,20	8,80	0	0	1,20	3,80			1
4,50	22,30	1,20	8,80	0,40	2,30	1,60	5,10			1
4,00	22,20	2,50	18,50	0,80	4,60	3,30	10,70			1
3,50	22,40	3,10	22,90	1,60	9,20	4,70	15,20			1
3,00	22,40	3,30	24,40	4,70	27,90	10,00	30,80	3,20	27,00	2
2,50	24,70	5,30	34,00	4,70	27,90	10,00		3,20	27,00	2
2,00	24,60	6,70	42,90	6,20	36,80	12,90	40,00	1,60	88,00	2
1,50	24,50	10,20	69,00	7,90	47,00	18,10	56,00			2
1,25	24,60	11,50	73,70	11,50	68,70	23,00	70,90			2
0,75	24,80	12,60	77,00	14,70	87,90	27,30	84,00	0,96	105,00	2
0,50	24,80	14,00	87,70	16,80	100,00	30,80	94,70			2
0,375	22,50	12,00	88,80	19,10	108,00	31,10	100,90	0,32	116,00	1
0,25	24,70	12,00	77,00	13,20	78,00	27,70	85,50	0,16	128,00	2
0,125	24,70	14,50	92,90	14,10	84,00	27,10	83,90			2
0,05	24,80	13,00	83,00	16,40	97,00	27,90	85,80	0,03	76,00	2
0,0375	24,80	11,50	73,70	14,70	87,90	27,90	97,00	0,02	75,00	2
0,025	24,40	17,00	108,90			31,70				2

racines étaient cornées au toucher et résistaient lorsqu'on les pressait entre les doigts. Les coupes faites dans ces racines ne présentaient, cependant, que des phénomènes habituels d'intoxication : retard dans la différenciation des éléments ligneux et de l'assise génératrice.



Courbe N° 17
Solutions d'alcool méthylique :

— Pourcentages de 0 à 24 heures.
--- — 24 à 48 heures.
- - - — 0 à 48 heures.

Influence de la benzoylecgonine sur la croissance des lupins

A côté de l'alcool méthylique, le dédoublement de la base cocaïne conduit à la benzoylecgonine.

Nous avons préparé la benzoylecgonine nécessaire à nos essais en suivant le mode établi par J. RÉGNIER d'après les indications de EINHORN (50).

« 5 grammes de cocaïne base pulvérisée sont chauffés avec 300 cc. d'eau distillée à reflux. La fusion de l'alcaloïde se produit

d'abord, puis, peu à peu la dissolution se fait. Après chauffage de 10 heures tout l'alcaloïde a disparu. La solution est ensuite placée quelques heures à 70°. Quand les cristaux commencent à se déposer, la solution est retirée de l'étuve et laissée au repos à la température du laboratoire. Il se fait une première cristallisation. Les cristaux sont essorés, pressés entre des doubles de papier-filtre et laissés à l'air 24 heures. La partie filtrée est traitée dans les mêmes conditions et ainsi de suite. Le rendement est presque quantitatif.

« Ces cristaux se présentent en belles aiguilles incolores qui fondent à 90-91°. Si on laisse la température s'élever, il se produit vers 120° une sorte d'ébullition, puis il se reforme de nouveaux cristaux qui fondent de nouveau à 195°. Le produit préparé par cristallisation directe de la solution est la benzoylecgonine hydratée $C^{16} H^{19} NO^1 + 4 H_2O$ (P.M. 361) qui, après fusion à 90-91°, perd son eau d'hydratation et se transforme en benzoylecgonine anhydre. Celle-ci se solidifie vers 125° et fond de nouveau vers 195°. »

En appliquant cette méthode au traitement de 20 gr. de base cocaïne nous avons obtenu très facilement 12 gr. de benzoylecgonine hydratée fondant à 90° au bloc MAQUENNE.

En partant de cette benzoylecgonine hydratée, nous avons d'abord préparé des solutions aqueuses de titres divers dont nous avons mesuré les pH à l'aide de la méthode colorimétrique. Ces solutions ont été ensuite additionnées d'un volume égal de liquide de SURVE et les milieux de culture ainsi obtenus ont été utilisés pour la culture des lupins. Dans tous les cas le pH des milieux de culture est resté compris entre 4.00 et 4.90. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant, avec, en outre, les pourcentages de croissance indiqués par D. I. MACIŦ dans des essais analogues.

La benzoylecgonine à la concentration de 2 %, empêche tout allongement des racines. La dose critique est représentée par une solution sensiblement égale à 1,75 %. Le retard dans le développement des racines diminue, d'abord, progressivement avec la concentration; mais à partir de 0.05 %, les solutions de benzoylecgonine n'exercent plus qu'une influence minime à laquelle les jeunes racines ne réagissent que très faiblement.

Si nous comparons les chiffres ainsi obtenus à ceux que nous avons rapportés dans le chapitre précédent, nous constatons que les solutions de benzoylecgonine exercent à peu près la même action que des solutions de chlorhydrate de cocaïne de même titre récemment préparées et non chauffées. La dose toxique de la benzoylecgonine (2 %) est identique à celle du chlorhydrate de cocaïne, et les résultats obtenus avec des solutions moins concentrées sont très voisins : par exemple, la croissance atteint 60 % de 0 à 24 heures et 42 % de 24 à 48 heures avec la benzoylecgonine, contre 63 % et 31,70 % avec le chlorhydrate de cocaïne quand ces produits sont en solution à 0.50 %.

La benzoylecgonine et le chlorhydrate de cocaïne en solutions fraîches exercent donc sensiblement la même action sur les racines de lupin. Cette constatation ressort également de l'examen du

TABEAU XXV

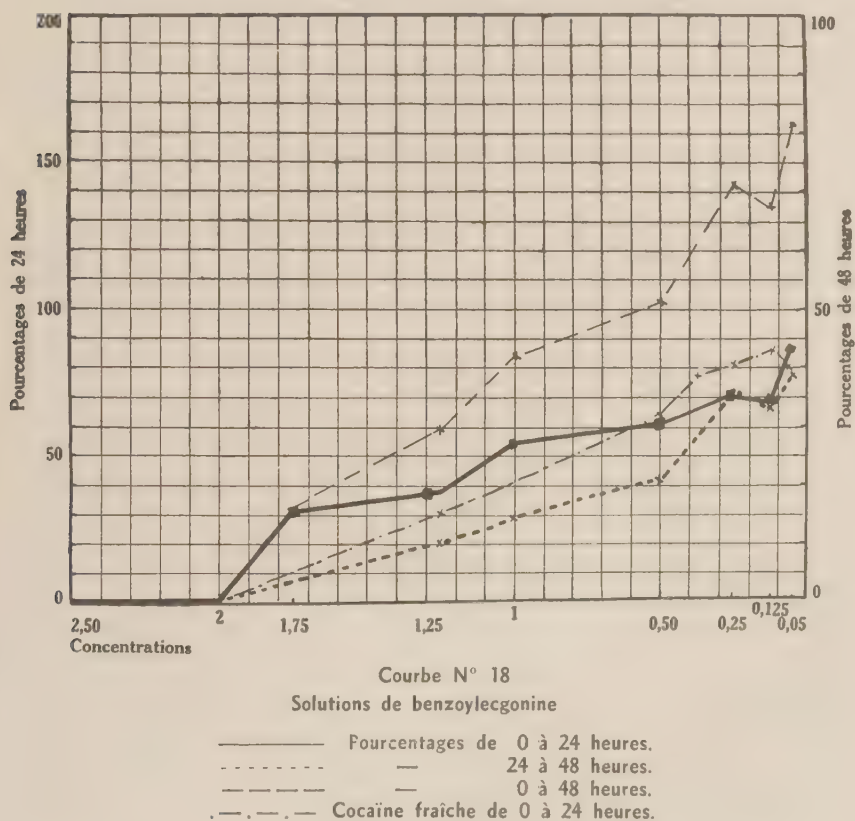
SOLUTIONS DE BENZOYLECGONINE HYDRATÉE

TEMOIN : LONGUEUR INITIALE : 27,80 m/m ACCROISSEMENT DE 0 A 24 HEURES : 18,00 m/m
DE 24 A 48 HEURES : 23,80 m/m

Concen- trations des solutions primitives	pH des solutions primitives	Concen- trations des milieux de culture	pH des milieux de culture	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures		Résultats de MACHT	
				Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Concen- trations	Pourcen- tages
6,00	3,60	3,00	4,00	0	0	0	0	0	0	3,29	0
5	3,70	2,50	4,10	0	0	0	0	0	0	2,639	3,70
4	3,70	2	4,40	0	0	0	0	0	0		
3,50	4,60	1,75	4,90	5,50	30,00	0,40	1,70	5,90	14,00		
2,50	5,00	1,25	4,90	6,80	37,70	5,80	20,00	12,60	30,00		
2,00	5,00	1,00	4,90	9,70	54,00	6,90	29,00	16,60	40,00	1,316	77,00
1,00	5,40	0,50	4,90	10,80	60,00	10,80	42,00	21,00	50,00		
0,50	5,50	0,25	4,80	12,70	70,50	17,30	72,00	30,00	71,00	0,329	100,00
0,25	5,50	0,125	4,90	12,40	68,30	16,00	67,00	28,40	67,30		
0,10	5,60	0,05	4,90	15,60	86,60	18,50	77,00	35,10	83,00		
0,075	5,60	0,0375	4,90	14,30	79,40	19,30	81,00	33,60	80,00		
0,05	5,60	0,025	4,90	15,60	86,60	21,90	92,00	37,50	89,00		
0,025	5,60	0,0125	4,90	17,00	94,40	18,30	76,00	35,30	84,00		
0,01	5,60	0,005	4,90	15,30	85,00	21,00	88,00	36,30	86,00		
				27,80							
				27,80							
				27,80							
				27,80							
				28,30							
				28,50							
				28,60							
				28,30							
				28,40							
				28,40							
				28,40							
				27,90							

graphique suivant sur lequel nous avons rassemblé les courbes de croissance obtenues avec des solutions de chlorhydrate de cocaïne fraîche et avec les solutions de benzoylecgonine.

D. I. MACHT, à la suite d'essais cependant moins nombreux que les nôtres, avait été amené à conclure que la benzoylecgonine était un peu moins toxique que la cocaïne. W. SIGMUND en étudiant l'action de solutions M/25, M/100 ou M/250 de chlorhydrate de cocaïne ou de benzoylecgonine sur la germina-



tion des vesces, de l'orge, du blé, des pois ou du colza, avait également fait des constatations analogues. Si les solutions diluées de ces deux composés présentent sensiblement la même toxicité, les solutions M/25 de benzoylecgonine sont un peu moins nocives que les solutions de chlorhydrate de cocaïne de même titre. Les résultats que nous avons obtenus confirment donc les observations de ces auteurs.

L'aspect morphologique des racines de lupin, provenant des solutions de benzoylecgonine, ne présentait rien de particulier.

Comme nous avons été habitués à le voir, les racines intoxiquées étaient blanches et molles, mais dès 1,25 %, elles ne présentaient plus aucun symptôme toxique. Pareillement dès la concentration de 1,75 %, la structure des racines ne différait pas de celle des témoins; dans les solutions plus concentrées, la différenciation du bois primaire et secondaire, de l'assise génératrice et des radicules présentait quelque retard.

Influence de l'acide benzoïque sur la croissance des lupins

Nous avons effectué nos essais avec un acide benzoïque « pur pour analyses » qui provenait de la maison RHONE-POULENC.

Les recherches ont été conduites de la façon habituelle et les résultats sont réunis dans le tableau ci-dessous. Nous y avons indiqué, en même temps, le titre et le pH initial des solutions d'acide benzoïque, la teneur des milieux de culture en acide benzoïque et la réaction de ces liquides, et les résultats trouvés par D. I. MACHT dans des essais analogues effectués avec du benzoate de sodium.

Ce tableau montre l'extrême toxicité de l'acide benzoïque vis-à-vis des racines de lupin. Des solutions à 0,0125 % empêchent les racines de se développer, la croissance n'atteint 60 % qu'à partir des solutions à 0,0005 %; et les jeunes racines sont encore retardées dans des solutions à 0,000125 %. Les courbes obtenues, en portant en fonction des concentrations les pourcentages de croissance, soulignent cette grande toxicité des solutions d'acide benzoïque. L'allongement des racines est très faible pour toutes les concentrations supérieures à 0,0025 %; ce n'est qu'à partir de cette dilution que les tracés s'élèvent rapidement. Les courbes, correspondant à l'acide benzoïque, présentent une forme incurvée caractéristique et il est intéressant de noter que les courbes correspondant aux solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées se rapprochent d'autant plus de cette forme que la durée du chauffage a été plus longue.

Au point de vue morphologique, après 24 heures de culture, seules les racines des solutions à 0,0125 %, très intoxiquées, étaient devenues blanches et ramollies. Après 48 heures, il en était de même des racines des solutions à 0,005 et 0,00375 % qui, en outre, portaient des taches brunes au collet.

Au point de vue anatomique, les symptômes d'intoxication aperçus ne différaient pas de ceux qui avaient été observés avec des solutions de chlorhydrate de cocaïne : le calibre des vaisseaux ligneux primaires est faible dans les solutions concentrées; les éléments ligneux secondaires apparaissent moins nombreux dès 0,00125 %; l'assise génératrice est réduite à quelques cellules

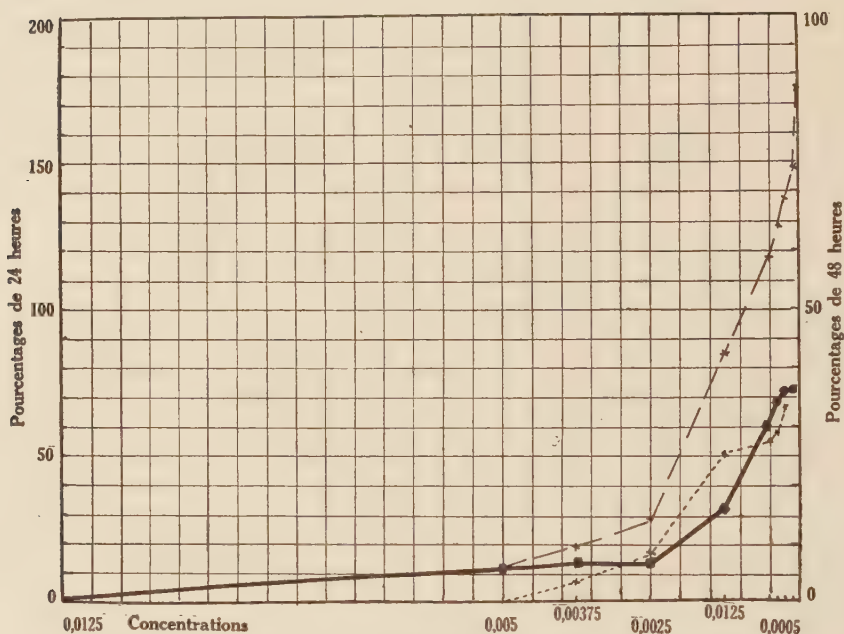
TABLEAU XXVI
SOLUTIONS D'ACIDE BENZOÏQUE

TEMOIN : LONGUEUR INITIALE : 25,60 m/m
ACCROISSEMENT DE 0 A 24 HEURES : 17,50 m/m
DE 24 A 48 HEURES : 18,50 m/m

Concen- trations des solutions primitives	pH des solutions primitives	Concen- trations des milieux de culture	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures		Résultats de MACHT	
					Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Concen- trations	Pourcen- tages
0,025	3,70	0,0125	4,10	25,75	0	0	0	0	0	0	0,007	0
0,01	4,10	0,005	4,30	25,75	1,60	9,00	0	0	1,60	4,40		
0,0075	4,10	0,00375	4,30	25,75	2,30	13,10	1,20	6,40	3,50	9,80	0,004	11,00
0,005	4,20	0,0025	4,40	25,80	2,40	13,60	3,00	15,60	5,40	15,00		
0,0025	4,20	0,00125	4,40	25,80	5,70	32,00	9,60	51,80	15,30	48,00	0,001	56,20
0,001	4,30	0,0005	4,40	25,40	10,50	60,00	10,40	56,20	20,90	58,00	0,0007	67,00
0,00075	4,30	0,000375	4,40	25,30	12,10	69,00	10,90	58,90	23,00	67,00		
0,0005	4,30	0,00025	4,40	25,30	12,70	72,50	12,30	66,00	25,00	69,00	0,0001	111,00
0,00025	4,30	0,000125	4,50	25,50	12,90	73,70	13,90	75,10	26,80	74,00	0,00007	83,00
0,0001	4,30	0,00005	4,50	25,60	15,50	88,50	16,10	87,00	31,60	87,00	0,00001	97,00
0,00005	4,30	0,000025	4,50	25,60	17,80	101,00	16,30	88,00	34,10	94,00		

cloisonnées entre le bois et le liber dès 0,0025 %. Cependant, les radicelles ont atteint partout leur développement normal.

Au cours de notre exposé bibliographique, nous avons rapporté que quelques auteurs avaient déjà entrevu cette grande toxicité de l'acide benzoïque. BOUCHARDAT avait remarqué que l'acide benzoïque à 1/1.000 tuait assez rapidement les plantes et RÉVEIL,



Courbe N° 19

Solutions d'acide benzoïque :

- Pourcentages de 0 à 24 heures.
- - - — 24 à 48 heures.
- - - - - 0 à 48 heures.

après avoir constaté qu'une menthe poivrée, arrosée avec une solution à 1/1.000 meurt en six jours, s'exprimait de la façon suivante : « L'acide benzoïque est l'acide organique qui tue le plus rapidement les plantes et à plus faible dose. Cette action toxique paraît tenir à autre chose qu'à sa nature acide. » Le benzoate de sodium, utilisé par D. I. MACHT dans ses recherches, ne s'est pas montré moins toxique que l'acide; les chiffres donnés par cet auteur sont très voisins de ceux que nous avons trouvés.

En résumé, la dose toxique de l'acide benzoïque est 0,0125 %, la dose critique est 0,005 %, la croissance atteint 50 % de celle de l'étalon pour une concentration de 0,0007 % et, enfin, la limite d'influence se situe à 0,000125 %.

Influence du benzoate de méthyle sur la croissance des lupins

Le benzoate de méthyle n'est pas un produit direct de la saponification de la cocaïne, mais le produit d'une réaction secondaire entre l'acide benzoïque et l'alcool méthylique libérés.

Le benzoate de méthyle est un liquide incolore, son odeur rappelle celle du salicylate de méthyle; il est peu soluble dans l'eau froide. Nous avons préparé, en dissolvant ce produit dans le liquide de SHIVE dilué au demi, une série de milieux de culture dont les concentrations variaient de 0.083 % à 0.0005 %. Nous avons dissous pour cela une quantité pesée de ce corps dans la quantité nécessaire d'eau distillée froide pour obtenir, sans chauffer, une solution complète qui nous a servi de solution mère. Tous ces milieux présentaient un pH voisin de 4.50. Leur toxicité, par rapport aux racines de lupin, a été déterminée de la manière habituelle, et les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant. Comme dans les cas précédents, nous y indiquons, en même temps, les chiffres trouvés par MACUR dans des expériences analogues. Le benzoate de méthyle se montre donc encore très toxique pour les végétaux. Il tue les racines à la dilution de 0.05 %, la dose critique est représentée par une solution à 0.0375 %, et seules les solutions d'un titre inférieur ou égal à 0.0005 % paraissent sans influence notable sur la croissance des lupins. D'une façon générale, les pourcentages de croissance sont plus faibles pendant la seconde période de l'épreuve que pendant la première. Le benzoate de méthyle est, cependant, moins nuisible que l'acide benzoïque. La comparaison des poids moléculaires montre, en effet, qu'à 122 gr. d'acide benzoïque correspondent 136 gr. de benzoate de méthyle; or des doses toxiques et des doses critiques trouvées pour le premier de ces composés sont quatre et six fois plus faibles que celles qui ont été déterminées pour le second. L'éthérification diminue donc nettement la toxicité de l'acide benzoïque pour les végétaux. Les pourcentages de croissance obtenus par MACHT dans ses recherches sur le benzoate de méthyle sont inférieurs à ceux que nous avons trouvé dans nos essais. Cependant les résultats obtenus ne sont pas très éloignés les uns des autres, et cet auteur avait déjà signalé cette différence de toxicité entre l'acide benzoïque et le benzoate de méthyle.

Les courbes, construites en utilisant les résultats précédents, rappellent celles que nous avons obtenues avec l'acide benzoïque. L'action inhibitrice, fortement marquée pour les concentrations comprises en 0.05 et 0.025, diminue ensuite assez rapidement à mesure qu'augmente la dilution.

L'étude anatomique des racines correspondantes à ces essais nous a fourni des résultats intéressants,

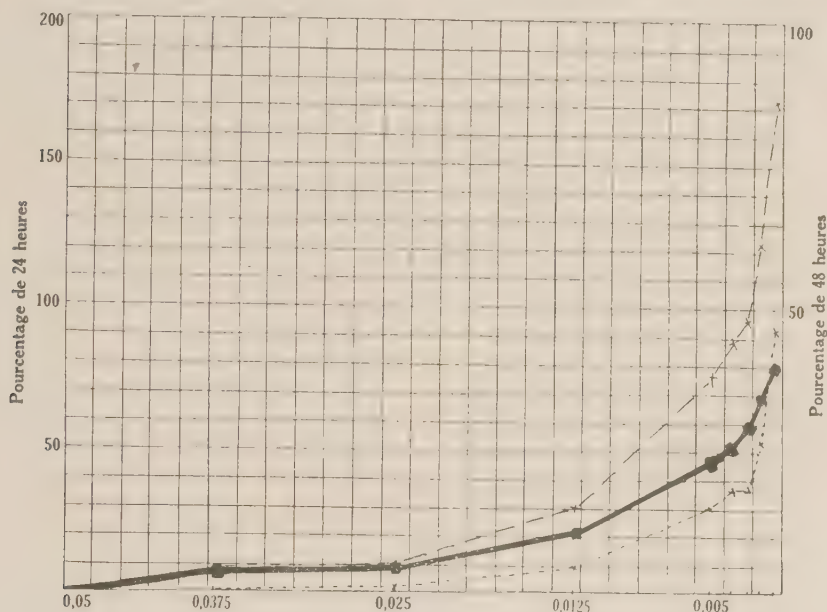
TABLEAU XXVII

SOLUTIONS DE BENZOATE DE MÉTHYLE

TEMCIN : LONGUEUR INITIALE : 21,90 m/m. ACCROISSEMENT MOYEN : DE 0 A 24 HEURES : 21,90 m/m
DE 24 A 48 HEURES : 20,60 m/m

Concen- trations des milieux de culture	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales en m/m	Accroissements de 0 à 24 heures		Accroissements de 24 à 48 heures		Accroissements de 0 à 48 heures		Résultats de MACHT	
			Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Concen- trations	Pourcen- tages
0,083	4,60	22,40	0	0	0	0	0	0	0,136	0
0,0625	4,50	22,20	0	0	0	0	0	0		
0,05	4,50	22,20	0	0	0	0	0	0		
0,0375	4,50	22,80	1,20	6,50	0	0	1,20	3,00		
0,025	4,40	21,90	1,40	7,60	0,50	2,20	1,90	4,00		
0,0125	4,40	21,90	3,80	20,80	2,00	9,70	5,80	15,00	0,014	0
0,005	4,30	21,80	8,50	46,50	6,20	30,00	14,70	37,00	0,007	13,00
0,00375	4,30	21,70	9,40	51,00	7,50	36,80	16,90	44,00		
0,0025	4,30	21,70	10,70	58,70	7,50	36,80	18,30	47,00		
0,00125	4,30	21,70	12,60	68,60	11,10	53,90	23,70	60,90	0,0014	30,00
0,0005	4,30	21,70	14,60	80,00	19,00	92,00	33,60	86,00	0,0007	74,00

Dans les solutions de benzoate de méthyle, les jeunes racines intoxiquées présentaient un aspect particulier. En plus du brunissement de leur extrémité, les racines provenant des solutions très nocives (de 0,083 à 0,00125 %) présentaient une apparence cornée, leur surface semblait durcie et, cependant, ces racines s'écrasaient facilement entre les doigts. Nous avons vu que les racines



Courbe N° 20
Solutions de benzoate de méthyle :

— Pourcentages de 0 à 24 heures.
 - - - - - 24 à 48 heures.
 ——— 0 à 48 heures.

qui cultivait dans les solutions d'alcool méthylique ont présenté un aspect identique.

La structure de ces racines était, en outre, tout à fait particulière et se différenciail nettement de tout ce que nous avons rencontré jusqu'ici. Ni l'acide benzoïque, ni l'alcool méthylique n'ont provoqué rien de semblable.

Les racines qui cultivait dans les solutions concentrées présentaient le retard dans le développement des méristèmes que nous étions accoutumé à voir dans les intoxications graves. Nous avons représenté ci-contre une coupe faite dans une racine qui avait cultivé dans la solution à 0,083 %. Ce dessin est à peu près identique à celui qui représente la structure d'une racine témoin au sortir de la mousse, avant la culture. Par contre, les racines

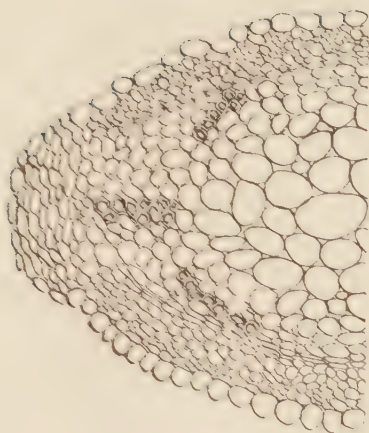


Fig. 12

Dessin d'une coupe faite dans une racine de Lupin après 48 heures de culture dans une solution de benzoate de méthyle à 0.00375 % (cylindre central)

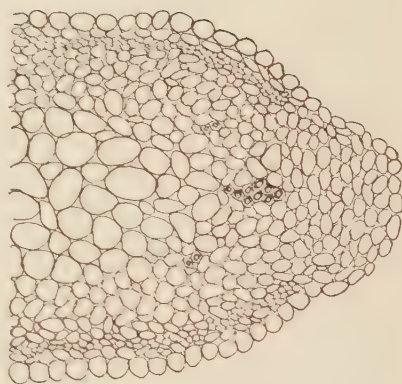


Fig. 13

Dessin d'une coupe faite dans une racine de Lupin après 48 heures de culture dans une solution de benzoate de méthyle à 0 gr. 083 % (cylindre central)

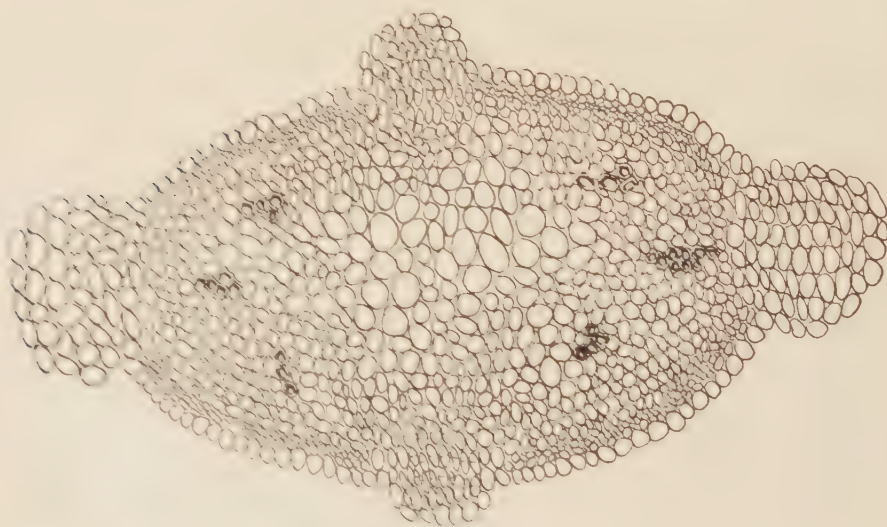


Fig. 14

Dessin d'une coupe faite dans une racine de Lupin après 48 heures de culture dans une solution de benzoate de méthyle à 0 gr. 0125 % (cylindre central)

qui avaient été placées dans les solutions à 0,025, 0,0125, 0,005 % présentaient des radicelles supplémentaires. Nous avons dessiné une coupe d'une racine qui avait cultivé dans une solution à 0,0125 %. Sous l'influence du benzoate de méthyle à cette concentration, quatre points végétatifs subissent une accélération considérable et donnent naissance à quatre radicelles symétriques : deux normales en face du bois primaire et deux autres au milieu des zones libériennes. Ce phénomène n'est visible que dans le cas des solutions à 0,025, 0,0125 et 0,005 %. Ces radicelles, d'autre part, ne sont pas anormales mais hâtives; elles sont, en effet, visibles sur des plantes témoins ayant séjourné plus longtemps dans le milieu nutritif. Nous avons laissé pendant dix jours, d'une part 100 plantes témoins dans la solution de SHIVE diluée au demi, et d'autre part 100 autres plantes dans un milieu de culture qui contenait 0,0125 % de benzoate de méthyle. Nous avons ainsi pu noter chez 22 des racines témoins l'apparition très nette de ces deux nouvelles radicelles, du moins près du collet; mais, pendant ce temps, ces radicelles apparaissaient, sur un espace plus important, sur toutes les racines qui cultivaient dans les milieux au benzoate de méthyle. Cette action ne se constate que pour des concentrations bien définies; à partir de 0,00375 % ce phénomène ne se présente plus.

Influence de l'ecgonine sur la croissance des lupins

L'ecgonine, noyau de la molécule cocaïne, constitue une des termes finaux de la désintégration du chlorhydrate de cocaïne sous l'influence de la chaleur ou du vieillissement.

Suivant l'exemple de D. I. MACHT, nous avons étudié d'abord le chlorhydrate de la base ecgonine. le sel utilisé a été préparé par salification directe de la base. A une molécule d'ecgonine ($C^9 H^{15} O^3 N H^{20} = 203$) correspond une molécule d'acide chlorhydrique (36 gr. 50). Nous avons dissous 2 grammes d'ecgonine dans 50 cc. d'eau distillée auxquels nous avons ajouté 9 cc. 83 d'acide chlorhydrique normal (0,359 gr.) et le tout a été amené à 100 cc. pour obtenir une solution mère à 2 gr., 359 %.

Nous avons préparé ensuite, à partir de celle-ci, des solutions à 0,25, 0,10, 0,05 et 0,025 % de chlorhydrate d'ecgonine dans l'eau distillée; leur réaction était très acide et l'est restée après addition du liquide de SHIVE. Nous avons donc effectué nos essais, d'une part sur les milieux de culture ainsi obtenus, d'autre part sur un milieu renfermant 0,125 % de chlorhydrate d'ecgonine et ramené à pH 4,50 par addition de potasse.

Les résultats ainsi obtenus sont réunis dans la première partie du tableau suivant. On trouve, dans ce tableau, la concentration des solutions initiales de chlorhydrate d'ecgonine, la concentration et le pH des milieux de culture, les pourcentages de croissance et les chiffres obtenus par D. I. MACHT dans ses essais similaires.

TABLEAU XXVIII

SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE D'ECGONINE ET D'ECGONINE BASE

TEMOIN	N° 1 : LONGUEURS INITIALES :	29,60 m/m	ACCROISSEMENT	
—	N° 2 :	29,10 m/m	MOYEN :	DE 0 A 24 HEURES : 19,90 16,60 13,50 10,10 m/m
—	N° 3 :	20,50 m/m		
—	N° 4 :	28,50 m/m		DE 24 A 48 HEURES : 27,80 24,50 8,00 24,40 m/m

Concentrations des solutions primitives	pH des solutions primitives	Concentration des milieux de culture	pH des milieux de culture	Longueurs moyennes initiales	Accroissement de 0 à 24 heures		Accroissement de 24 à 48 heures		Accroissement de 0 à 48 heures		Résultats de MACHT		N° SERIES
					Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Valeur absolue	Pourcen- tages	Concen- trations	Pourcen- tages	
CHLORHYDRATE D'EGGONINE													
0,25	2,20	0,125	2,80	30,10	0	0	0	0	0	0	0,11	0	1
0,10	2,40	0,05	3,00	29,90	0	0	0	0	0	0	0,055	0	1
0,05	2,80	0,025	3,20	30,00	6,50	32,60	6,80	24,40	13,30	28,00	0,022	78,00	1
0,025	3,00	0,0125	3,70	30,00	12,00	60,00	25,20	90,60	37,20	77,90	0,0022	83,00	1
SOLUTION REAJUSTEE													
0,250	2,20	0,125	4,50	28,70	16,10	97,00	26,90	109,00	43,00	104,00			2
EGGONINE BASE													
5,00	6,10	2,50	5,00	28,80	13,50	133,00	23,70	97,10	37,20	107			4
2,00	5,60	1,00	4,80	20,70	15,20	105,00	12,50	156,00	26,70	124,00			3
0,50	5,30	0,25	4,60	20,70	15,90	117,00	10,60	132,00	26,50	123,00			3

L'examen de ce tableau met encore en évidence l'influence, très importante, de la réaction sur la croissance des racines de lupin. Tandis qu'une solution de chlorhydrate d'ecgonine à 0,05 %, de pH 3,00, empêche tout allongement des racines, et qu'une solution à 0,0125 %, de pH 3,70, ralentit encore notablement la croissance pendant le premier jour de l'épreuve; une solution de chlorhydrate d'ecgonine à 0,125 %, de pH 4,50, n'exerce aucune influence sur le développement des racines. Le chlorhydrate d'ecgonine est donc beaucoup moins défavorable pour le lupin que le laissaient supposer les expériences de MACHT. Il est très probable que ce dernier auteur n'a pas tenu compte, dans ses essais, de la réaction des milieux de culture. La grande acidité du chlorhydrate d'ecgonine a suffi pour conférer aux liquides de culture même faiblement chargés d'alcaloïde, une concentration en ions H suffisante pour inhiber tout accroissement des racines, et MACHT a dû attribuer à l'ecgonine le ralentissement ou l'arrêt de la croissance provoqués simplement par l'acidité de la solution.

Cette explication est d'autant plus vraisemblable que les résultats de D. I. MACHT s'accordent bien avec ceux que nous avons trouvés avec les milieux non réajustés.

Puisque l'acidité du chlorhydrate d'ecgonine empêche de l'utiliser directement dans nos essais, il était préférable de lui substituer la base ecgonine elle-même. Nous avons donc préparé, de la manière habituelle, à partir de solutions aqueuses simples additionnées ensuite de leur volume de liquide de SHIVE, des milieux de culture qui contenaient 0,25, 1,00 et 2,50 % d'ecgonine base. Ces milieux, dont les pH restaient compris entre 4,60 et 5,00, ont été utilisés pour la culture des lupins et les résultats obtenus sont indiqués dans la deuxième partie du tableau précédent.

L'ecgonine base à des concentrations comprises entre 0,25 et 2,50 %, loin d'être nocive pour les racines de lupin, stimule au contraire leur croissance. Les racines provenant des solutions expérimentées avaient bel aspect sans que l'examen de leur structure traduise réellement une avance sur les témoins. La faible quantité d'ecgonine dont nous disposions ne nous a pas permis de faire des essais systématiques. C'est pourquoi, sans vouloir affirmer que l'ecgonine à des concentrations inférieures à 2,50 % stimule le développement des racines, nous pouvons cependant conclure que l'ecgonine, dans les conditions de nos essais, n'exerce aucune action nocive sur la croissance des lupins.

La toxicité du chlorhydrate d'ecgonine n'est due qu'à son acidité, elle disparaît si l'on amène le milieu à une réaction convenable, ce qui explique les contradictions que révèle la comparaison de nos résultats avec ceux de MACHT.

Nos résultats confirment donc les observations de W. SIGMUND. Cet auteur avait, en effet, constaté que l'ecgonine, à concentration moléculaire égale, était moins toxique pour les plantes que la benzoylecgonine et que la cocaïne.

Comparaison des résultats obtenus

Pour faciliter la comparaison nous avons réuni, dans le tableau suivant, les concentrations caractéristiques trouvées pour les différents produits expérimentés. Comme dans le chapitre précédent, nous avons indiqué, en même temps, les indices de toxicité correspondants. Ces indices permettent de comparer facilement l'activité du produit considéré à celle du chlorhydrate de cocaïne, prise comme unité. Un produit sera d'autant plus toxique, pour les racines de lupin, que son indice de toxicité sera plus élevé.

Les doses toxiques trouvées pour un produit isolé, peuvent parfois se trouver modifiées quand ce composé est associé à d'autres substances. D. I. MACHT a d'ailleurs esquissé des recherches dans ce sens, qui ne paraissent pas avoir donné des résultats précis. Cependant, étant donné que la benzoylecgonine et, surtout, l'alcool méthylique sont moins toxiques que le chlorhydrate de cocaïne, nous pouvons conclure que la saponification méthylique de la cocaïne, avec mise en liberté d'alcool méthylique et de benzoylecgonine, ne peut pas se traduire par une augmentation de la toxicité des solutions pour les racines de lupin. Par suite, les accroissements de toxicité, constatés dans nos essais, ne peuvent être attribués qu'à une mise en liberté d'acide benzoïque.

La technique phytopharmacologique, que nous préconisons, permet donc de séparer les deux processus possibles de saponification de la molécule cocaïne et de n'étudier que la saponification benzoïque. L'extrême sensibilité des jeunes racines de lupin pour l'acide benzoïque (une solution à 1/143.000 diminue la croissance de 50 %) permet de montrer que la libération de l'acide benzoïque commence très rapidement mais que les quantités d'abord formées sont infimes dans les conditions normales de stérilisation ou de conservation. La toxicité des solutions de chlorhydrate de cocaïne n'augmente, en effet, que faiblement après un chauffage de 15 minutes à 120° et une conservation ne dépassant pas une année.

Il apparaît d'abord assez difficile de tirer des pourcentages de croissance observés dans nos essais, des indications précises sur les quantités d'acide benzoïque libérées. Des déterminations rigoureuses nécessiteraient de nombreux essais et la reconstitution « synthétique » de solutions de cocaïne altérées à l'aide de proportions variables de ce sel et de ses produits de dédoublement. Cependant les résultats obtenus permettent, dans différents cas, une certaine approximation.

Prenons, par exemple, les solutions de chlorhydrate de cocaïne à 0,50 %, réglées à différents pH, et stérilisées 15 minutes à 120°. Ces solutions étaient susceptibles de libérer par saponification complète 0 gr. 18 % d'acide benzoïque.

TABLEAU XXIX
COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS AVEC DIFFÉRENTS PRODUITS DE DÉDOUBLEMENT
DE LA COCAÏNE

Nature des solutions	Doses toxiques	Indice de toxicité des doses toxiques	Doses critiques	Indices de toxicité des doses critiques	Concentrations donnant un pourcentage 50 %	Indices de toxicité correspondants	Concentrations limites d'influence
Chl. de cocaïne frais	2	1	1,25	1	0,80	1	0,125
Alcool méthylique	7,50	0,26	5,00	0,25	1,80	0,44	0,50
Benzoylécgonine	2,00	1	1,75	0,71	1,05	0,76	0,05
Benzoate de méthyle	0,05	40	0,0375	33	0,004	200	0,0005
Acide benzoïque	0,0125	160	0,005	250	0,0007	1142	0,00005

Les pourcentages de croissance, observés pendant les deux journées de l'épreuve, pour les solutions non tamponnées, ont été les suivants : pH 0 : 0 et 0; pH 1 : 10 et 0; pH 7,90 : 14 et 23. L'acide benzoïque étant au voisinage de la dose toxique ou de la dose critique, de 150 à 250 fois plus toxique que le chlorhydrate de cocaïne, nous pouvons, dans une détermination approchée, négliger la toxicité propre du chlorhydrate de cocaïne et admettre que le ralentissement de la croissance a été produit uniquement par l'acide benzoïque libéré. Dans ces conditions, si nous nous reportons aux tableaux et aux courbes représentatives établis pour cet acide nous trouvons que les quantités d'acide benzoïque susceptibles de fournir de tels pourcentages de croissance sont les suivantes : pour pH 0, au moins 0,0125 %; pour pH 1,00, 0,005 %, et pour pH 7,90, 0,0025 %.

Comme les solutions de chlorhydrate de cocaïne utilisées étaient susceptibles de fournir 0,18 % d'acide benzoïque, nous pouvons dire que les proportions d'acide benzoïque libérées par la stérilisation sont les suivantes : au moins 6,9 % pour un pH initial égal à 0; 2,7 % pour pH 1,00; et 1,30 % pour pH 7,90.

Il est curieux de constater que ces chiffres sont sensiblement quatre fois plus faibles que ceux qui avaient été obtenus par R. DIETZEL et O. STEEGER dans les essais que nous avons rapportés précédemment. D'après ces auteurs, en effet, la proportion d'acide benzoïque libérée après un chauffage d'une heure à 98° atteindrait 40 % pour une solution réglée à pH 0, 10 % pour une solution réglée à pH 1,00 et 5 % pour une solution de pH 8,00.

CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous nous sommes proposés de rechercher si l'utilisation d'un test végétal permettait de déceler les altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne.

Pour cela, *dans un premier chapitre*, nous avons d'abord passé en revue les principaux travaux relatifs à l'influence exercée par des composés divers sur le développement des végétaux. La plupart de ces recherches, effectuées dans un but purement botanique, avaient le plus souvent pour objet de déterminer les éléments favorables ou défavorables à la vie de la plante. Elles nous montrent cependant qu'il suffit parfois d'ajouter au milieu de culture de très faibles quantités d'un produit déterminé pour observer un ralentissement très net de la croissance ou même la mort du végétal. La plante vivante peut donc constituer, dans certains cas, un réactif extrêmement sensible. Tandis que les premiers auteurs s'étaient surtout attachés à si-

gnaler la forte toxicité pour les végétaux de certains composés comme les acétates, les chlorates, l'acide benzoïque, les sels ammoniacaux, etc.; des recherches, plus récentes, montrent que quelques hormones peuvent également exercer une action défavorable (SCHICK) ou que divers éléments, comme l'argent métalliques, sont susceptibles, par simple contact, de provoquer une stimulation de la croissance (G. BOHN et A. DRZEWINA). Cependant ce n'est qu'à partir de 1922 que D. I. MACHT a eu l'idée d'inverser le problème et d'utiliser un test végétal pour mettre en évidence la présence d'un principe toxique dans un mélange quelconque.

Parmi toutes les méthodes proposées pour étudier l'action de différents composés sur le développement d'un végétal, la technique de D. I. MACHT se recommande par sa simplicité et sa rapidité. Nous avons été amenés à l'utiliser dans nos recherches d'autant plus qu'elle avait déjà fourni, à cet auteur, des résultats particulièrement intéressants dans des travaux portant sur des sujets très divers : toxicité des produits de décomposition du chlorhydrate de cocaïne, influence de la lumière polarisée sur les solutions de cet alcaloïde, étude des composés minéraux et organiques du mercure, recherches sur l'anémie pernicieuse, etc.

Avant de commencer nos recherches proprement dites, nous avons jugé indispensable d'étudier les différentes phases de la méthode de D. I. MACHT afin d'en préciser tous les détails. Le deuxième chapitre de notre travail est ainsi consacré à la mise au point de la technique que nous avons utilisée. La méthode de D. I. MACHT, rappelons-le, consiste simplement à faire germer des graines de lupin en les plaçant à l'étuve, sur un lit de mousse humide. Quand les jeunes racines ont atteint de 20 à 35 mm. de longueur, on les immerge dans un milieu de culture constitué par la solution de SHIVE diluée au demi et additionnée du liquide à examiner. Au bout de 24 heures de séjour à l'étuve on compare l'allongement des racines ainsi traitées à celui de racines témoins placées simplement dans la solution de SHIVE étendue de son volume d'eau distillée.

Nous avons été ainsi amenés à examiner l'influence de différents facteurs sur la germination préalable des graines et sur l'allongement des jeunes racines placées dans les solutions minéralisées.

L'étude de la germination (composition du fond de germination, degré d'humidité favorable, disposition des graines, influence de la température, durée du séjour à l'étuve, variations saisonnières, etc.) nous a simplement permis de compléter les observations de D. I. MACHT. La mise en culture des jeunes racines nous a, au contraire, conduit à préciser certains détails, non signalés par cet auteur, et à modifier sensiblement la technique originale. Toutes nos mesures ont été faites en utilisant, comme point de repère, la légère dépression visible au niveau du collet; pour un même essai nous avons toujours pris soin de constituer des séries aussi semblables que possible. De plus, tandis que les comparaisons de D. I. MACHT ne portent que sur les accroissements observés pendant la première journée de séjour à l'étuve, nous avons jugé bon d'effectuer les mêmes opérations pendant une nouvelle période

de vingt-quatre heures et nous avons ajouté aux mesures linéaires, seules utilisées par notre prédécesseur, l'étude de la structure anatomique des racines intoxiquées. A chacun de nos essais correspondent ainsi trois pourcentages de croissance : croissance de 0 à 24 heures, de 24 à 48 heures et de 0 à 48 heures. La comparaison de tous ces résultats nous a toujours donné des indications utiles et nous a permis, en particulier, de déterminer, à côté de la *dose toxique minima* de D. I. MACHT, représentée par la plus faible concentration qui tue les racines en 24 heures, une nouvelle dose toxique, inférieure à la première, que nous désignerons sous le nom de *dose critique* et qui correspond à la plus faible concentration permettant une croissance appréciable des racines pendant la première journée de l'épreuve, mais empêchant tout allongement à partir du second jour.

Nous avons enfin étudié, tout particulièrement, l'influence de la réaction du milieu de culture sur le développement des jeunes racines de lupin et nous avons constaté que la solution de SHIVE, étendue de son volume d'eau, ne permet un accroissement normal que lorsque son pH est compris entre 4 et 6. En dehors de ces limites, les accroissements observés sont nettement inférieurs à ceux des témoins, et, pour un pH égal ou inférieur à 3, la croissance devient difficile et même impossible.

Nous avons exposé dans les deux derniers chapitres, nos observations relatives à l'influence exercée par le chlorhydrate de cocaïne ou par ses produits de dédoublement, sur la croissance des jeunes racines de lupin.

La troisième chapitre est réservé à l'étude des solutions de chlorhydrate de cocaïne, préparées par simple dissolution du sel dans l'eau distillée, et essayées soit aussitôt après leur préparation, soit après un chauffage à l'autoclave plus ou moins prolongé, soit enfin après stérilisation et conservation à la température ordinaire pendant un temps plus ou moins long.

Dans *le quatrième chapitre*, nous avons tout d'abord examiné l'influence de la réaction initiale sur la stabilité des solutions de chlorhydrate de cocaïne stérilisées à l'autoclave, dans les conditions habituelles. Des solutions à 1 % de cet anesthésique, additionnées ou non de sels tampons, ont été pour cela réglées à des durées comprise entre 6 et 14 mois est sensiblement équivalente à une solution de même titre, récemment préparée, mais pH compris entre 0 et 7,9, par simple addition d'acide chlorhydrique ou de potasse et stérilisées pendant 15 minutes à 120°; leur toxicité a été ensuite déterminée, vis-à-vis des racines de lupin, par le procédé habituel.

Enfin nos essais ayant montré que les altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne se traduisaient toujours par une augmentation de la toxicité de ces solutions pour les jeunes racines de lupin, nous avons repris les premiers travaux de D. I. MACHT et nous avons recherché, parmi les principaux produits susceptibles de prendre naissance au cours de la décomposition du chlorhydrate de cocaïne, les composés capables de provoquer cet accroissement de toxicité.

Nous avons ainsi été conduit aux conclusions suivantes :

1° Les solutions de chlorhydrate de cocaïne, récemment préparées et non chauffées, sont peu nocives pour les jeunes racines de lupin. Seules les concentrations supérieures ou égales à 2 % sont susceptibles d'empêcher toute croissance.

2° Le chauffage à l'autoclave augmente l'action inhibitrice exercée par les solutions de chlorhydrate de cocaïne sur la croissance des lupins. La toxicité s'accroît d'abord rapidement pendant les premières heures de chauffage, puis de plus en plus lentement à mesure que l'action de la chaleur se prolonge. Si des solutions stérilisées dans les conditions habituelles présentent à peu près la même activité que des solutions fraîches, des solutions chauffées pendant un temps suffisant peuvent acquérir une toxicité considérable. Les concentrations nécessaires pour empêcher tout accroissement des jeunes racines sont respectivement égales à 1,875, 1,25, 0,50, 0,25, 0,125 et 0,0375 % lorsque les solutions ont été portées à 120° pendant 15 minutes, 2 heures, 5 heures, 10 heures, 24 heures ou 48 heures.

3° Le vieillissement accroît la toxicité des solutions de chlorhydrate de cocaïne pour les racines de lupin. Une solution de chlorhydrate de cocaïne, stérilisée pendant 15 minutes à 120° et conservée, à l'obscurité et à la température ordinaire, pendant une durée comprise entre 6 et 14 mois présente une toxicité sensiblement équivalente à celle d'une solution de même titre, récemment préparée, mais chauffée à 120° pendant une heure ou une heure et demie. Une conservation de 10 années paraît équivalente à un chauffage de 5 heures à 120°.

4° La réaction initiale exerce une grande influence sur la stabilité des solutions de chlorhydrate de cocaïne.

a) Les solutions non tamponnées réglées à des pH compris entre pH 2 et pH 7, par addition d'acide chlorhydrique ou de potasse, sont, après un chauffage de 15 minutes à 120°, relativement peu toxiques pour les racines de lupin. L'action de la chaleur, prolongée même pendant une heure, ne modifie pas sensiblement les pH limites ainsi déterminés. Au contraire, lorsqu'on s'éloigne de cette zone favorable, la toxicité des solutions chauffées augmente rapidement et les solutions présentant un pH initial supérieur à 7,5 ou inférieur à 1,70 sont, après stérilisation, nettement défavorables à la croissance des lupins.

b) L'addition d'une faible quantité d'un sel tampon (phosphate monopotassique) réduit la zone des pH favorables à la conservation de l'activité des solutions de chlorhydrate de cocaïne. Seules les solutions réglées à des pH compris entre 2,20 et 3,90 sont, après chauffage, relativement peu toxiques pour les jeunes racines, tandis que les préparations voisines de la neutralité (pH supérieurs à 6,0) sont déjà fortement altérées par la stérilisation.

c) Une série d'essais effectués avec les mélanges tampons pré-

conisés par A. RIPPEL pour étudier l'influence de la réaction initiale sur la stabilité des solutions de chlorhydrate de cocaïne nous a permis de mettre en évidence, à la suite de différents auteurs, la grande toxicité de l'acide acétique et des acétates pour les végétaux. Par contre, les solutions phosphatées utilisées par A. RIPPEL sont trop fortement tamponnées pour permettre d'effectuer, avec notre technique, des déterminations systématiques.

d) Il est intéressant de constater que seules les solutions dont la toxicité n'a pas été notablement augmentée par le chauffage présentaient un pH initial voisin de 3 ou de 4, ou atteignaient facilement cette concentration en ions H pendant la stérilisation. Dans les autres cas, l'accroissement de la toxicité a été d'autant plus grand que le milieu s'opposait davantage à cette modification de la réaction initiale.

5° Parmi les principaux composés susceptibles de prendre naissance au cours des altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne, seuls l'acide benzoïque et le benzoate de méthyle exercent sur la croissance des lupins une action inhibitrice supérieure à celle du chlorhydrate de cocaïne. L'alcool méthylique se montre très peu nocif, la benzoylécgonine agit sensiblement de la même façon que le chlorhydrate de cocaïne et l'écgonine, à la concentration de 2,50 %, loin de s'opposer à la croissance des racines, stimule au contraire leur développement.

L'acide benzoïque et accessoirement le benzoate de méthyle sont, au contraire, extrêmement toxiques pour les lupins. Les jeunes racines sont tuées dès le premier jour dans une solution d'acide benzoïque à 0,0125 %; leur développement n'atteint que la moitié de celui des témoins dans une solution d'acide benzoïque à 0,0007 %. Ces chiffres, très voisins des résultats obtenus par D. I. MACHT en utilisant le benzoate de sodium, permettent de préciser les observations de BOUCHARDAT et de RÉVEIL au sujet de la grande toxicité de l'acide benzoïque pour les végétaux. Enfin le benzoate de méthyle est un peu moins nocif que l'acide benzoïque.

Les différences d'activité ainsi observées nous montrent que les accroissements de toxicité constatés dans nos essais avec les solutions de chlorhydrate de cocaïne chauffées ou vieilles résultent uniquement de la mise en liberté d'acide benzoïque.

Cette étude des produits de dédoublement de la molécule cocaïne nous a amené, le plus souvent, à confirmer et à préciser les remarques déjà faites par D. I. MACHT. Cependant, nos conclusions au sujet de l'écgonine diffèrent complètement de celles qui avaient été formulées par cet auteur. Tandis que D. I. MACHT rapporte que le chlorhydrate d'écgonine à la concentration de 0,055 % empêche tout accroissement des racines, nous trouvons qu'une solution d'écgonine à 2,50 % favorise au contraire leur croissance. L'écgonine est donc peu toxique pour les végétaux, ce qui confirme les observations déjà faites par W. SIGMUND, et il est vraisemblable que l'inhibition de la croissance constatée

par D. I. MACHT dans ses essais a été provoquée, non pas par la toxicité propre du chlorhydrate d'ecgonine, mais par l'acidité élevée de la solution.

6° La toxicité des corps que nous avons étudiés se traduit par un retard dans l'allongement des racines de lupin; c'est presque le seul symptôme manifeste d'intoxication, l'aspect des racines n'est modifié que dans les intoxications graves qui sont suivies de la mort de la plante. Dans ce cas, les racines perdent leur turgescence et blanchissent. En même temps, la structure des racines intoxiquées est caractérisée par un ralentissement dans la différenciation du bois et du liber.

Nous n'avons pas noté de réactions de défense. Dans un cas (benzoate de méthyle à certaines concentrations), nous avons aperçu quelques particularités dans le développement des radicelles, et, dans un autre cas (cocaïne chauffée 15 minutes à 12°), nous avons observé une stimulation du développement des vaisseaux du bois.

7° Les solutions de chlorhydrate de cocaïne sont d'autant plus toxiques pour les racines de lupin qu'elles sont plus altérées et qu'elles renferment une plus grande proportion d'acide benzoïque libéré. La technique phytopharmacologique, que nous préconisons, conduit ainsi à des résultats comparables à ceux qui ont été obtenus par divers auteurs en utilisant des méthodes fort différentes. En particulier, les mesures des anesthésies effectuées par J. RÉGNIER et par ses collaborateurs et les déterminations physico-chimiques faites par R. DIETZEL et O. STEEGER ont conduit ces auteurs à des conclusions concordant parfaitement avec les nôtres. De plus, la toxicité relativement très faible de l'alcool méthylique et de la benzoylecgonine par rapport à celle de l'acide benzoïque nous a permis de séparer les deux processus de saponification de la base cocaïne et de n'étudier que la saponification benzoïque.

L'utilisation d'un test végétal permet donc de déceler les altérations des solutions de chlorhydrate de cocaïne, et il est bien évident que la technique que nous venons d'étudier pourra être étendue à de nombreuses recherches. On pourra, par exemple, l'employer pour l'essai de substances médicamenteuses toutes les fois que ces substances d'une part et d'autre part les impuretés qui peuvent les accompagner ou leurs produits de décomposition exercent des actions nettement différentes sur la croissance des racines. De plus, étant donné la sensibilité des lupins pour certains composés (une solution d'acide benzoïque à 0,0007 % réduit de 50 % l'allongement des racines, cette méthode pourra parfois être utilisée pour apprécier de très faibles quantités d'un composé déterminé présent dans une solution.

On pourra reprocher à la technique phytopharmacologique de substituer à l'étude directe des propriétés thérapeutiques d'un médicament, ou même d'une hormone sur un animal l'examen d'un phénomène accessoire assez différent consistant dans l'étude de la toxicité de cette substance vis-à-vis d'un végétal. Cepen-

dant, certains essais physiologiques d'usage courant ne constituent déjà que des mesures de toxicité, et l'introduction d'un test végétal aura toujours l'avantage d'introduire dans nos mesures un réactif vivant qui, dans certains cas, pourra se montrer extrêmement utile. Enfin, cette technique présente quelques avantages sur les méthodes zoopharmacologiques habituellement employées. Elle est extrêmement simple, rapide, peu coûteuse et ne nécessite aucune manipulation spéciale. De plus, l'utilisation d'un nombre convenable de graines permettra toujours d'obtenir des moyennes suffisamment précises.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse,

COUTIERE.

Vu :
le Doyen de la Faculté,
Paul GUERIN.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLETY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ACHARD. — Sur la nutrition des végétaux et sur les altérations qu'éprouvent les différentes substances par la végétation. *Mémoire à l'Académie de Berlin*, 1731.
2. ARRHÉNIUS. — A possible correlation between the fertility of rice soils and their titration curves. *Soil Science*, 1922, **14**, 21.
3. Aso (K.). — Über die Wirkung des Kieselfluornatrium auf das Pflanzenleben. *Bull. Coll. of Agric.*, Tokyo, 1902, **5**.
4. Aso (K.). — Can Potassium bromid exert any stimulating action on Plants? *Bull. Coll. of Agric.*, Tokyo, 1904, **6**.
5. Aso (K.). — Can Thorium and Cerium salts exert any stimulating action on Plants? *Bull. Coll. of Agric.*, Tokyo, 1904, **6**.
6. Aso (K.). — Stimulating influence of sodium fluorid on garden plants. *Bull. Coll. of Agriculture*, Tokyo, 1906, **7**, 83.
7. Aso (K.). — Injurious action of acetates and formiates on Plants. *Bull. Coll. of Agriculture*, Tokyo, 1906, **7**, 13.
8. Aso (K.). — On the action of Naphtalen on Plants. *Bull. Coll. of Agric.*, Tokyo, 1907, **7**, 413.
9. ATKINS (W.). — The Hydrogen ion concentration of plants cells. *Proceed. Roy. Dublin. Soc.*, 1922, **16**, 414.
10. BARAT. — Die addition von Säuren und Alkalien durch lebendes Protoplasma. *Ztschr. f. allg. Physiol.*, 1905, **5**, 1035.
11. BECQUEREL (P.). — Action de l'air liquide sur les graines. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1905, **140**, 1652.
12. BECQUEREL (P.). — Action de l'éther et du chloroforme sur les graines sèches. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1905, **140**, 1049.
13. BLAIR (B.). — The effect of metallic ions on the growth of Hyacinths. *Ann. applied. Biol.*, 1926, **13**, 157.
14. BOHN (G.) et DRZEWINA (A.). — Accélération et inhibition de la croissance des plantes par l'argent métallique. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 638.
15. BOKORNY (Th.). — Über den Einfluss verschiedenen Substanzen auf die Keimung der Pflanzensamen. *Bioch. Zeitschr.*, 1913, **50**, 1.

16. BOUCHARDAT. — De l'action qu'exercent sur les végétaux les produits organiques qui sont des poisons pour les animaux. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1843, **17**, 112.
17. BOUCHARDAT. — De l'influence du sol relativement à l'action des poisons sur les plantes. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1846, **22**, 674.
18. BRACONNOT. — Recherches sur la force assimilatrice dans les végétaux. *Ann. Chimie et Phys.*, 1807, **61**, 187.
19. BRACONNOT. — Recherches sur l'influence des plantes sur le sol. *Ann. Chimie et Phys.*, 1839, **72**, 27.
20. DE CAMARGO (Th.), BOLLIGER (R.) et CORREA DE MELLO (P.). — Sur l'influence de la concentration des ions H du milieu de culture sur le développement du caféier. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1929, **188**, 878.
21. CAUVET. — Etudes sur le rôle des racines dans l'absorption et l'excrétion. *Thèse doct. pharmacie*, Strasbourg, 1861.
22. CHARPENTIER (A.). — Action du chlorhydrate de cocaïne sur la fermentation alcoolique et sur la germination. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1885, **37**, 17.
23. CHATIN (A.). — Etudes de physiologies végétales faites au moyen de l'acide arsénieux. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1845, **20**, 21.
24. CHATIN (A.). — Etudes expérimentales sur l'action des sels, des bases, des acides et des matières organiques sur la végétation. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1852, **35**, 786.
25. CHATIN (A.). — Recherches expérimentales relatives à l'action qu'exercent les sels sur la végétation lorsqu'ils sont employés à équivalents égaux. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1854, **37**, 269.
26. CLARK. — On the toxic value of mercuric chloride and its double salts. *Journ. of Physical. Ch.*, 1901, **6**, 289.
27. COGGESHALL (M.). — Influence of acetic, propionic, normal butyric and sulfuric acids and potassium acetate on elongation of primary roots of seedlings of white lupine. *Plant. Physiol.*, 1931, **6**, 389.
28. COLIN (H.) et DE RUF (J.). — Absorption comparée des sels de Baryum, Strontium, Calcium par les plantes vivantes. *Revue Gén. de Bot.*, 1910, **22**, 337.
29. COLIN (H.) et DE RUFZ (J.). — Sur l'absorption du baryum par les plantes. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1910, **150**, 1074.
30. COLLINS (J. L.). — Giftresistenz alter Elodea Blätter. *Protoplasma*, 1931, **12**, 549.
31. CORDIER. — Action des alcaloïdes sur les végétaux. *Assoc. Franç. pour l'avancement des sciences*, 1906, 388.
32. CORNET (P.) et GILLES (Ed.). — Effets abiotiques produits par les rayons ultra-violet sur certaines plantes. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 1367.
33. CORNEVIN (C.). — Action des poisons sur la germination des végétaux dont ils proviennent. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1891, **113**, 274.
34. COUPIN (H.). — Sur la toxicité du chlorure de sodium et de l'eau de mer à l'égard des végétaux. *Revue Gén. de Bot.*, 1898.
35. COUPIN (H.). — Sur la toxicité des sels de cuivre à l'égard des végétaux supérieurs. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1898, **127**, 400.
36. COUPIN (H.). — Sur la toxicité des composés chromés à l'égard des végétaux supérieurs. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1898, **127**, 377.

37. COUPIN (H.). — Sur la toxicité comparée des composés du nickel et du cobalt à l'égard des végétaux supérieurs. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1901, **53**, 489.
38. COUPIN (H.). — Sur la toxicité des composés de l'argent, du mercure, de l'or, du platine et du palladium à l'égard des végétaux supérieurs. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1901, **53**, 509.
39. COUPIN (H.). — Comparaison entre le pouvoir toxique de quelques composés minéraux à l'égard des végétaux supérieurs et leur pouvoir antiseptique. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1901, **53**, 509.
40. COUPIN (H.). — Influence des vapeurs d'acide formique sur la végétation du *Rhizopus nigricans*. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1908, **147**, 80.
41. COUPIN (H.). — De l'influence de diverses substances volatiles sur les végétaux supérieurs. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1910, **151**, 1066.
42. CROKER (W.), KNIGHT (L.) et ROSE. — *Science*, 1910, **21**, 636.
43. CUGINI (G.). — Intorno all' azione dell' etere e del chloroforme sugli organi irritabili delle piante. *Nuovo Giorn. Bot. Ital.*, 1881, **13**, 288.
44. DIETZEL (R.) et STEEGER (O.). — Über die Zersetzlichkeit von Alkaloiden in wässriger Lösung, insbesondere bei der Sterilisation - 6 mitteilung : Ekgonine. *Arch. d. Pharm. u. Berd. deutsch. Pharm. Ges.*, 1933, **271**, 251; 7 mitteilung : Kokaine. *Arch. d. Pharm.*, 1933, **271**, 521.
45. D'IPPOLITO. — Sulla immunità delle piante ad alcaloide propri veleni. *Le Staz. Sper. Agr. Ital.*, 1913, **46**, 393.
46. DUBOIS (M.). — Action de la cocaïne sur la germination. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1885, **37**, 40.
47. DUFFRENOY (J.) et RADOEFF (A.). — Effets du formol sur la germination et la croissance des plantules de tabac. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 386.
48. DUFFRENOY (J.) et RADOEFF (A.). — Action du nitrate d'argent et de l'hexyl-résorcine sur la germination du tabac. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 195.
49. EGNUS MINA. — L'influence du radium sur le développement du cresson alénois. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 1094.
50. EICHORN (A.). — Action des colorants vitaux sur la croissance des racines. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 374.
51. FASSBENDER et GREVILLIUS. — Über die Einwirkung von Essigsäurendämpfen und verdünnten Essigsäurelösungen auf Pflanzen. *Landwirtschaftl. Versuchstation*, 1899.
52. FEHER (D.) et VAGI (S.). — Untersuchungen über die Einwirkung von Na_2CO_3 auf Keimung und Wachstum der Pflanzen. *Bioch. Zeits.*, 1926, **175**, 172.
53. FIEHL. — Etudes sur l'absorption et l'élimination de l'arsenic dans les végétaux. *Jour. Chim. Médic.*, 1848, **24**, 548.
54. FOURCROY (M.). — Action de l'acide chlorhydrique sur les plantes. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 309, **115**, 506 et 927.
55. FRED et LEONIS. — Influence of Hydrogen ion concentration of medium on the reproduction of alfalfa bact. *Jour. Bact.*, 1917, **2**, 629.
56. FRERKING (H.). — Über die Giftwirkung der lithium Salze auf Pflanzen. *Flora*, 1915, **108**, 449.
57. GAUNERSDORFER. — Das Verhalten der Pflanze bei Vergiftungen special durch Lithiumsalz. *Landwirtschaftl. Versuchstation*, 1887, **34**, 171.

58. GIANELLI. — D'après Réveil (173).
59. GIBBS (D.). — *Ameri J. Botany*, 1934, **21**, 645.
60. GÖPPERT (H.). — Sur l'irritabilité des étamines du *Berberis vulgaris*. *Ann. de Science Natur.*, 1828, **15**, 69.
61. GÖPPERT (H.). — Recherche sur l'action de l'acide cyanhydrique et de quelques autres substances sur les plantes. *Ann. de Sciences Natur.*, 1828, **14**, 384.
62. GRAFE (B.) et RICHTER. — Über den Einfluss der Narkotika auf der chemische Zusammensetzung von Pflanzen. *Anz. K. Akad. Wiss. Wien. Math. Nat.*, 1911, **48**, 536.
63. GROS (O.). — Über die Beständigkeit der Basen der Lokalanästhesik in Lösung. *Arch. für exp. Path. und Pharmac.*, 1912, **67**, 126.
64. GROS (O.). — Über Narkotica und Lokalanesthetica. *Arch. f. exp. Path. und Pharmac.*, 1910, **62**, 380, **63**, 80, 1911, **67**, 126.
65. GUÉRIN (P.) et LORMAND (Ch.). — Action du chlore et de certaines vapeurs sur les végétaux. *Compt. Rend. Acad. des Sciences*, 1920, **170**, 401.
66. HAAS. — Toxic effect of boron on fruit trees. *Bot. Gazett.*, 1929, **88**, 113.
67. HASELHÖFF. — Über die Einwirkung von Borverbindungen auf das Pflanzenwachstum. *Landw. Versuchstat.*, 1913, **79**, 399.
68. HÉBERT. — Toxicité relative des sels de chrome, d'aluminium et de magnésium; comparaison avec les propriétés analogues des terres rares. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1907, **147**, 337.
69. HEFFTER. — *Handbuch der experiment. pharmacologie*. Berlin, 1920.
70. HÉRISSEY (H.). — Sur le pouvoir rotatoire du chlorhydrate de cocaïne. *Jour. Pharm. et chimie*, 1898, **7**, 59.
71. HILBARD. — The antitoxic action of chloral hydrate upon copper sulphate for *Pisum sativum*. *Cent. Bakt.*, 1913, **38**, 303.
72. HOPKINS (F.) and WANN (P. B.). — Relation of Hydrogen ion concentration to growth of chlorella and to the availability of iron. *Bot. Gazett.*, 1926, **81**, 353-376.
73. HYKES (O. V.). — De l'influence de quelques hormones sur la feuillaison et le développement des végétaux. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 629.
74. JOHNES et SHIVE. — Influence of wheat seedlings upon the hydrogen ion concentration of nutrient sol. *Bot. Gazett.*, 1922, **73**, 391.
75. JOLYET. — Action des vapeurs de mercure éthyle sur la respiration chlorophyllienne des feuilles. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1873, **25**, 225.
76. JULIO (J.). — Cité par O. P. Réveil (173).
77. JUMELLE (H.). — Influence comparée des anesthésiques sur l'assimilation et la transpiration chlorophylliennes. *Compt. Rend. Acad. Scien.*, 1890, **111**, 461.
78. KAHLO (H.). — Ein Beitrag zur Giftwirkung der Schwermetallsalze auf das Pflanzenplasma. *Bioch. Zeitsch.*, 1921, **122**, 39.
79. KANDA (M.). — Studien über die Reizwirkung einiger Metallsalze auf das Wachstum höherer Pflanzen. *Jour. of Colleg. of Sciences Tokyo*, 1904, **19**, 1.
80. KATCHIONI. — Influence of Hydrogen ion concentration on the development and growth of buckwheat. *Bull. Stat. Plant. Acclimat. Leningrad*, 1927, 96.
81. KENNETH W. DEUT. — Studies on toxic action. The toxicity of aliphatic esters towards potato tuber. *Protoplasma*, 1934, **21**, 62-72.

82. KOBLOWSKA (A.). — The influence of Plants on the concentration of Hydrogen ions in the medium. *Jour. Ecology*, 1934, **22**, 396.
83. KOCH. — Über die Wirkung von Aether und Schwefelkohlenstoff auf höherer und niederer Pflanzen. *Cent. Bakt.*, 1911, **31**, 175.
84. KOGL (F.), HAAGEN (S.) et ERXELEBEN (H.). — De l'influence des auxines sur le développement des racines et sur la nature chimique de l'auxime de tigelles des plantes herbacées. *J. Physiol. Chim.*, 1934, **228**, 104.
85. KRUTICKI. — Die Wirkung des Cocains auf Mimosa. *Scripta Botanica Horti Univer. Imp. Petropolitonae*, 1887, **2**, 1.
86. KWASSNIKOFF. — Stimulierende Wirkung des Arsensäurennatriums auf das Pflanzenwachstum. *Landw. Wissensch. Moskau*, 1926, **3**, 74.
87. LABAND. — Zur Verbreitung des Zinkes in Pflanzen. *Zeitsch. für Unters. der Nahrungs-u.-Genussmittel.*, 1901, **4**, 489.
88. LEFÈBURE. — Expérience sur la germination des plantes. Strasbourg, an IX.
89. LESURE. — Stérilisation à l'autoclave des solutions aqueuses de chlorhydrate de cocaïne pour injections hypodermiques. *J. Pharm. Chim.*, 1908, **27**, 474 et 526.
90. LIEBIG. — Chimie organique appliquée à la physiologie végétale, traduit par Ch. Gerhardt, Paris 1844.
91. LINK (H. P.). — Sur les trachées des plantes. *Ann. de Sciences Nat.*, 1831, **23**, 144.
92. LINK (H. P.). — Elemento philosophiae botanicae, edition altera, Berolini, 1857.
93. LINK (H. P.). — Sur la respiration des plantes. *Bull. des Sciences de Férussac*, 1857, **19**, 56.
94. LIOT (A.). — Variation du pH des solutions de chlorhydrate de cocaïne soumises à la stérilisation. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1925, **32**, 83.
95. LÆW. — Über die Wirkung des Urans auf Pflanzen. *Bull. Coll. of Agricult. Tokyo*, 1902.
96. LÆW et TSUKAMOTO. — On the poisonous action of Dicyanogen. *Bull. of the Colleg. of Agriculture Tokyo*, mai 1904.
97. LÆW. — Über die Giftwirkung des Fluornatriums. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 1892.
98. LOUYER. — Lettre à M. Dumas sur l'absorption de l'anhydride arsénieux. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1844, **19**, 336.
99. LOUYER. — Note sur l'absorption des poisons par les plantes. *Journ. de Pharm. et Chim.*, 1842, **9**, 94.
100. LOUYER. — Mémoire sur l'absorption des poisons métalliques par les plantes. Bruxelles, 1841.
101. LUTZ (L.). — Recherches sur la nutrition des végétaux à l'aide de substances azotées de nature organique. *Thèse doct. ès sciences*, Paris 1899.
102. LUTZ (L.). — Recherches sur l'emploi de l'hydroxylamine comme source d'azote pour les végétaux. *Compt. Rend. Soc. Sav.*, Paris, 1899.
103. LUTZ (L.). — Sur le rôle des alcaloïdes envisagés comme source d'azote pour les végétaux. *Bull. Sciences Pharmacol.*, 1904, **11**, 118.
104. LUTZ (L.). — Sur l'emploi de la leucine et de la tyrosine comme sources d'azote pour les végétaux. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 1905, **140**, 380.

105. MACAIRE. — Mémoire pour servir à l'histoire des assolements. *Annales de chimie et physique*, 1833, **52**.
106. MACHT (D.). and KUBOTA. — *Jour. Pharm. and Exper. Therap.*, 1919, **13**, 31.
107. MACHT (D. I.) et LÉVINGSTON (M. B.). — Effect of cocaïne on the growth of *Lupinus albus* a contribution to the comparative pharmacology of animal and plant protoplasma. *Jour. of gen. Physiol.*, 1922, **4**, 573.
108. MACHT (D. I.) et LUBIN (D. S.). — Phytopharmacological study of menstrual toxin. *Jour. of Pharmacolog.*, 1924, **22**, 413.
109. MACHT (D. I.). — A phytopharmacological study of menstrual toxin. *Jour. of Pharmacol. and exper. therap. Baltimore*, 1923-1924, **22**, 413-466.
110. MACHT and HYNDMAN. — Relation between the chemical structure of bile acids and their phytopharmacological and zoopharmacological reaction. *Jour. of Pharmac.*, 1924, **22**, 483.
111. MACHT (D. I.) and HILL. — The effect of ultra-violet, X ray, and radium emanation on the toxicity of normal blood. *Jour. Gen. Physiol.*, 1924, **6**, 671.
112. MACHT et ANDERSON (M.). — Effective ultra-violet. *Am. Jour. Physiol.*, 1927, **49**, 2017.
113. MACHT (D. I.). — Phytopharmacological and photopharmacological studies, on leprosy blood serum. *J. Philippine, Islands, M. A.*, décembre 1928, **8**, 523-524.
114. MACHT (D. I.) et ANDERSON. — Clinical and experimental Studies on phototherapy in pernicious anémia. *Journ. of Pharmacol. and exp. therap.*, 1928, **34**, 365.
115. MACHT (D. I.) et LEACH (H.). — Die Wirkung von polarisierten Licht auf Kokain. *Arch. fur exp. Ph. und Pharmakol.*, 1929, **146**, 177.
116. MACHT (D. I.) et LOSEE (J. R.). — Phytopharmacological study of eclampsia. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1930, **46**, 217.
117. MACHT (D. I.) et LEACH (H.). — Phytopharmacological study of puerperal bloods. *Bull. Johns Hopkins, Hosp.*, mars 1930, **46**, 225.
118. MACHT (D. I.). — Effect of some inorganic and organic mercurials on growth of *Lupinus albus*. *Am. Journ. of Bot.*, 1931, **18**, 598.
119. MACHT (D. I.). — Growth of *Lupinus albus* seedlings in solutions of some amines. *Amer. Jour. Bot.*, 1931, **21**, 72.
120. MACHT (D. I.). — Phytopharmacological studies on sera of pemphigus, syphilis and leprosy. *Acta Dermat.*, 1931, **18**, 126.
121. MACHT (D. I.) et HARDEN (W. C.). — Comparative pharmacology of some condensation products of phenols with aliphatic aldehyds. *J. Pharmacol. and Exper. Therap.*, avril 1933, **47**, 377.
122. MACHT et PAULSON (M.). — Phytopharmacology of stomach washings in various digestive disorders and pernicious anemia. *J. Lab. et Clin. Med.*, novembre 1933, **19**, 155-165.
123. MACHT (D. I.) et DAVES (M.). — Giftigkeit von α und β Nicotinen und Narcotinen für *Lupinus albus*. *Amer. Journ. Bot.*, 1935, **22**, 329-332.
124. MARCET. — De l'action des poisons sur le régime végétal. *Ann. de Chimie et Phys.*, 1825, **29**, 102.
125. MARCASSI. — Studio comparativo dell azione di alcuni alcaloidi sulle piante nella oscurità e alla luce. *Nuovo Giorn. Botan. Italian*, 1895.

126. MAQUENNE (L.) et DEMOUSSY (E.). — Sur la toxicité de quelques sels à l'égard des feuilles vertes. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1910, **151**, 178.
127. MEISSNER. — Sur la présence du cuivre dans les cendres des végétaux. *Ann. de Chimie et Phys.*, 1817, **4**, 106.
128. MER (E.) et CORNU (M.). — De l'absorption des matières colorantes par les radicelles des plantes. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1878, **30**, 204.
129. MEYER (L.). — Sur les variations du rH apparent du sol pendant la croissance des plantes. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1934, **198**, 499.
130. MEYER (L.). — Contribution à une étude physicochimique du sol végétal. Le rH apparent et la croissance des plantes. *Arch. de Phys. Biolog.*, 1934, **11**, 191.
131. MEZZACHOLI (G.) et AMATI (A.). — Action de quelques alcaloïdes sur le développement de l'*Aspergillus niger*. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1932, **16**, 366.
132. MEZZACHOLI (G.) et AMATI (A.). — Action de quelques alcaloïdes sur le métabolisme des glucides par l'*Aspergillus niger*. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1933, **18**, 161.
133. MIANI. — Über die Einwirkung von Kupfer auf das Wachstum lebender Pflanzenzellen. *Berich. der deutschen botanischen Gesellsch.*, 1901, **18**, 461.
134. MOLISCH. — Das Radium und die Pflanze. *Schrift. z. Verbr. natur. Kenntnisse. Wien.*, 1913, 145-171.
135. MOLLIARD (H.). — Action de quelques substances organiques sur la forme et la structure de la feuille. *Bull. Soc. Bot.*, 1906, **53**, 61.
136. MOREL (J.). — Action de l'acide borique sur la germination. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1892, **114**, 131.
137. MORHARDT (P. E.). — Les données de la phytopharmacologie et les phytohormones. *Presse Médicale*, 1935, **97**, 1959.
138. MORKOWINE (M.). — Recherches sur l'influence des anesthésiques sur la respiration des plantes. *Rev. Gén. de Bot.*, 1899, **11**, 289.
139. MORKOWINE (M.). — Recherches sur l'influence des alcaloïdes sur la respiration des plantes. *Rev. Gén. de Bot.*, 1901, **13**, 109 et 212.
140. MOSSO (U.). — Action de quelques alcaloïdes sur la germination des graines et sur le développement successif de la plante. *Arch. Ital. Biolog.*, 1894, **21**, 230.
141. MOSSLER (G.). — De la décomposition des solutions de sels d'alcaloïdes par la stérilisation. *Bull. Sc. Pharmac.*, 1914, **21**, 205.
142. MOUTET. — Action du rayonnement de l'uranium sur la végétation. *Compt. Rend. Acad. Agriculture*, 1932, **18**, 28.
143. NAKAMURA (M.). — Can Lithium and Cæsium Salts exert any stimulative action on phanerogams. *Bull. of Coll. of Agri. Tokyo*, 1904.
144. NICOLAS. — Influence du formol sur les végétaux supérieurs. Action de l'hexaméthylène-tétramine. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1922, **175**, 1437.
145. NICOLAS. — Influence du formol et de l'hexaméthylène-tétramine sur la morphologie et la structure du haricot. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1923, **176**, 404.
146. NICOLAS. — L'action de l'hexaméthylène-tétramine sur les végétaux supérieurs. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1925, **180**, 860.

147. NOBECOURT (P.). — Action de quelques alcaloïdes sur le *Botrytis cinerea*. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1921, **172**, 706.
148. NYMANN (M.) et BJÖRKSTEN. — Fällung von Kokain Lösungen mit Platinchlorid. *Pharmazeutische Zentralhalle für Deutschland*, 1911, **52**, 71.
149. OSLEN. — Studies on the Hydrogen ion concentration of the soil and its significance to the vegetation especially to the natural distribution of plants. *Compt. Rend. Labor. Carlsberg*, 1923.
150. OTTO (R.) and KOOPER (W. P.). — Untersuchung über den Einfluss giftiger alkaloid-führender Lösungen auf Boden und Pflanzen. *Landw. Jahrb.*, 1910, **39**, 397.
151. PHILIPS. — Cité par Réveil (173).
152. PHILIPS (F.). — The absorption of metallic oxydes by plants. *Chemic. News*, 1882.
153. PITTENGER (P. S.). — The biologic standardization of local anæsthetics with reference to the effects of sterilisation on solutions of cocaïne and procaine. *Journ. of the Amer. Pharm. Assoc.* 1921, **10**, 746.
154. PRINCEPS. — Mémoire sur l'influence des poisons sur les plantes douces de mouvements excitables. *Ann. de Chim. et Phys.*, 1828, **39**, 85.
155. PRINCEPS. — Mémoire pour servir à l'histoire des assolements. *Ann. de Chimie et Phys.*, 1828, **52**, 225.
156. PORT (J.). — Recherches sur l'action des sels neutres sur la croissance des plantules en ce qui concerne l'influence de leur concentration. *Acta Inst. Hort. Bot. Univers Tartuensis zu Dorprat*, 1906, **53**, 61.
157. RADOEFF (A.). — Stimulation de la croissance par divers agents chimiques chez le blé et le riz. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 580.
158. RADOEFF (A.). — Stimulation de la croissance par des sels minéraux, des colorants vitaux et divers composés organiques. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 955.
159. RAINEY. — Recherches expérimentales sur la cause de l'ascension et du mouvement de la sève dans les végétaux. *Liechtal*, 1843, 508. (D'après Réveil.)
160. REBELLO (S.). — Action des glandes à sécrétion interne et de leurs extraits sur le développement des plantes. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1924, **90**, 1095.
161. RÉGNIER (J.). — Essai de mesure de l'anesthésie produite sur les terminaisons nerveuses (cornée, muqueuse linguale) par les anesthésiques locaux. Comparaison des pouvoirs anesthésiques. *Bull. Sciences Pharm.*, 1923, **30**, 580 et 646.
162. RÉGNIER (J.). — Influence de la concentration des ions hydrogène des solutions de chlorhydrate de cocaïne sur l'anesthésie de la cornée. *Bull. Sciences Pharm.*, 1924, **31**, 513.
163. RÉGNIER (J.). — De l'augmentation des anesthésies produites sur la cornée par alcalinisation des solutions de chlorhydrate de cocaïne. *Bull. Sciences Pharm.*, 1925, **32**, 271.
164. RÉGNIER (J.). — Sur l'hydrolyse spontanée de la base cocaïne en solution aqueuse à la température ordinaire. *Bull. Sciences Pharm.*, 1925, **32**, 405.
165. RÉGNIER (J.) et DAVID (R.). — Du rôle de la tension superficielle dans l'augmentation des anesthésies produites par alcalinisation des solutions de chlorhydrate de cocaïne. *Bull. Sciences Pharm.*, 1925, **32**, 513.

166. RÉGNIER (J.). — Influence de la concentration des ions H sur un phénomène physiologique. Anesthésie de la cornée par le chlorhydrate de cocaïne. *A. Brulliard, Saint-Dizier*, 1925.
167. RÉGNIER (J.) et CARDOT (H.). — Contribution à l'étude pharmacologique du chlorhydrate de cocaïne. Action sur la chroxaxie du nerf moteur. *Bull. Sciences Pharm.*, 1926, **33**, 10-77.
168. RÉGNIER (J.). — Mesure de l'activité des anesthésiques locaux. *Bull. Sciences Pharm.*, 1927, **34**, 641 et 693.
169. RÉGNIER (J.) et VALETTE (G.). — Action du chlorhydrate de cocaïne sur un nerf sensitif non itératif (nerf lingual du chien, voie sensitive du réflexe linguo-maxillaire). *Bull. Sciences Pharm.*, 1929, **36**, 284.
170. RÉGNIER (J.). — Action du chlorhydrate de cocaïne sur les troncs nerveux. Comparaison de l'action sur les fibres sensibles à l'action sur les fibres motrices. *Bull. Sciences Pharm.*, 1929, **36**, 401.
171. RÉGNIER (J.), LIOT (A.) et DAVID (R.). — De la perte du pouvoir anesthésique des solutions de chlorhydrate de cocaïne sous l'influence du chauffage à haute température et d'une conservation trop prolongée. *Bull. Sciences Pharm.*, 1933, **40**, 271 et 353.
172. RÉGNIER (J.) et DAVID (R.). — Sur le maintien de l'activité physiologique des solutions de chlorhydrate de cocaïne. *Bull. Sciences Pharm.*, 1934, 321.
173. RÉVEIL (O. P.). — De l'action des poisons sur les plantes. *Thèse doctorat ès sciences*, Lyon, 1865.
174. RICHEL. — Action des formiates sur la croissance de certaines plantes cultivées en pot. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1924, **178**, 1922.
175. RIPPEN (A.). — Über den Einfluss der Reaktion auf die Haltbarkeit von cocainlösungen. *Arch. der Pharmac.*, 1920, **258**, 287.
176. ROBBINS (W.). — On isoelectric point for plant tissue and its significance. *Am. Jour. of Bot.*, 1923.
177. ROBBINS et SCOTT. — Studies on isoelectric point for the plant tissue. *Jour. of Agr. Research.*, Washington, 1923.
178. ROY (L.). — Etude de la concentration en ions hydrogène de quelques liquides injectables. Influence de la stérilisation. *Jour. Pharm. et Chimie*, 1925, **1**, 525.
179. RUDOLPH (R.). — Effect of seeds upon hydrogen ion concentration of soil. *Bot. Gazett.*, 1922, **74**, 215.
180. DE SAUSSURE (Th.). — Recherches chimiques sur la végétation. *Paris, an XII*, 1804.
181. SAWA (S.). — Are coffein and antipyrine in higts degree poisonous for plants? *Bull Coll. Agric. Tokyo*, 1902, **4**.
182. SAWA (S.). — On the poisonous action of potassium persulfate on plants. *Bull. Coll. Agric. Tokyo*, 1902, **4**.
183. SAWA (S.). — Has urea any poisonous action on phanerogams. *Bull. Coll. Agric. Tokyo*, 1902, **4**.
184. SCHIK. — Das Menstruationsgift. *Wiener Klin. Wocheuschr.*, 1920, n° 19.
185. SCHMALFUSS (K.). — Observations sur les effets des sels dans les cultures en milieu liquide. *Flora*, 1933, **128**, 197.
186. SCHWARTZ. — Wirkung von Alcaloiden auf Pflanzen in Licht und Dunkel. *Inaugural dissertation*, 1897.
187. SEELANDER (K.). — Untersuchungen über die Wirkung des Kohlenoxyds auf Pflanzen. *Beihefte z. botan. Zentralb. Cassel*.

188. SELLEI (J.). — Die Wachstum fördernde und hemmende Wirkung der Farbstoffe auf Pflanzen. *Arch. Pharmaz. Ber. Deutsch. Pharm. ges.*, 1935, **273**, 285.
189. SIGMUND (W.). — Über die Einwirkung von stoffwechselnde Produkten auf die Pflanzen. *Bioch. Ztschr.*, 1914, **62**, 299.
190. SOLLMAN. — A manual of pharmacology and its applications to therapeutics and toxicology. W. B. Saunders Cie, Philadelphia-London, 1932.
191. SPARTSEHL. — Über den Einfluss des Chlorwassers auf die Keimung. *Ost. Bot. Ztschr.*, 1904, **9**, 325.
192. STADNITSCHENKO (N.). — Über die Wirkung des Cocains auf Helepilze. *Bull. Acad. Sciences U.R.S.S.*, 1934, **7**, 666.
193. STEIN. — De la présence de l'arsenic dans les organes des plantes. *Jour. Chimie Médic.*, 1851, **27**, 281.
194. STILES et JORGENSEN. — Studies on permeability: the exosmoses of electrolytes as a criterium of antagonistic ion action. *Ann. Bot.*, 1915, **29**, 349.
195. STOKLASA (J.). — Influence du sélénium et du radium sur la germination des graines. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1922, **174**, 1075.
196. STOKLASA (J.). — De l'influence de l'uranium et du plomb sur la végétation. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 1913, **156**, 153.
197. STSCHEPKINA. — Einwirkung der pH Konzentration auf die Entwicklung der Tabakpflanze. *Bull. Jard. Bot. Princ. U. R. S. S.*, 1927, **26**, 444.
198. SUKATSCHIEFF (L.). — Bemerkung über die Einwirkung des Alkohols auf das Keimen einiger Samen. *Beiheft. Botan. Centralblatt*, 1902, **12**.
199. SUSUKI (S.). — Über die Giftwirkung des ferrocyankaliums auf phanerogamen. *Bull. of. Coll. of Agri. Tokyo*, 1902.
200. SVEND AAGE SCHOU et HELM (E.). — Studien over injection medicin: 1° kokainoplosningers sonderling Ved sterilisering og ved opbevaring. *Dansk Tidsskrift for Farmaci*, 1920, **112**, 259.
201. SWANBACK (I.). — The effect of boric acid on the growth of tobacco plants in nutrient solutions. *Plant Phys.*, 1927, **2**, 475.
202. TAKABAYASHI (S.). — On the poisonous action of ammonium salts upon plants. *Bull. of the Imp. Univers. of Tokyo*, 1897.
203. TARGIONI TOZZETTI. — Expériences qui excluent la possibilité d'absorption de l'acide arsénieux par les plantes saines et vivantes. *Ann. Sciences Natur.*, 1845, **5**, 177.
204. THEORODESCO (Em.). — Influence de l'acide carbonique sur la forme et la structure des plantes. *Compt. Rend. Acad. Sciences*. 1898, **127**, 335.
205. THIMANN, KENNETH et KÖPFLI. — Identité des substances favorisant la croissance et formant les racines des plantes. *Nature*, 1935, **135**, 101.
206. THOMSON. — Über die Wirkung von Schwefelsäure Eisenoxydul auf die Pflanze. *Stizundberichte der naturforschergesellschaft zu Dorprat*, 1833.
207. TUFFIER et ARNAUD. — De la stérilisation des solutions de co-caine. *Presse médicale*, 1901, 58.
208. VACHA (G.) et HARVEY. — The use of ethylene, propylene and similar compounds in breaking the rest period of tubers bulbs cuttings and seeds. *Plant. Phys.*, 1927, **2**, 187, **3**, 149.
209. VAN LAER et LOMBAERS. — Recherches sur l'influence des variations de l'acidité libre dans la germination de l'orge. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1921, **85**, 1115.

210. VAUQUELIN. — D'après Réveil.
211. VOGEL. — Sur la germination des plantes et des graines dans différentes substances minérales, notamment dans les terres, les oxydes métalliques et les sels. *Jour. Pharm.*, 1830, **16**, 405.
212. WYETH. — The effect of acides, alkalis and sugar on the growth of bact. coli. *Biochem. Journal*, 1919.
213. WYPEL. — Uber den Einfluss einiger chloride, fluoride, bromide auf Algen., *Jahresbericht des niederösterreichischenlandes Realgymnasiums in Waidhofen an der Thuya*, 1893.
214. WALLACE. — Studies on the sensitivity of *Mimosa pudica*. The effect of certain animal anesthetics upon steep movements. *Amer. Jour. of Bot.*, **18**, 102.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	11
--------------------	----

CHAPITRE PREMIER LA PHYTOPHARMACOLOGIE. PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS.

Travaux de P. O. Réveil.....	18
Travaux antérieurs à 1914.....	22
Anesthésiques généraux et composés volatils.....	22
Premiers travaux sur les alcaloïdes.....	23
Action des composés minéraux et de quelques composés bien définis	26
Travaux de W. Sigmund sur les alcaloïdes.....	32
Travaux récemment parus.....	34
Action des éléments minéraux.....	34
Action des composés radio-actifs.....	36
Action des anesthésiques généraux.....	36
Action des alcaloïdes et de différents composés organiques.....	37
Travaux de D.-I. Macht.....	39
CONCLUSIONS.	44

CHAPITRE DEUXIÈME TECHNIQUE UTILISÉE DANS NOS ESSAIS

Exposé de la technique de D.-I. Macht.....	47
Examen de la méthode de Macht, essais personnels.....	49
Le matériel	49
Les graines	50
Les étuves	50
La solution nutritive.....	51
La technique.....	53
Hydratation	53
Germination	55
Durée	55
Température	56
Obscurité	56
Aspect des graines germées.....	56
Culture	56
Mesure des jeunes racines.....	57
Préparation des solutions.....	58
Température	58
Durée	59
Obscurité et évaporation.....	59
Aspect des jeunes plantes.....	59
Expression des résultats.....	59
Les pourcentages de croissance.....	61
Les tableaux	61
Exemple numérique	63
Les courbes	

<i>Considérations morphologiques</i>	63
Généralités sur la structure des jeunes racines de Lupin blanc	64
Obtention des coupes.....	64
Coloration	64
Structure des racines avant culture.....	65
Structure des racines après culture.....	67
Principales anomalies.....	68
Influence de la réaction du liquide de culture sur la croissance du Lupin blanc	70

CHAPITRE TROISIÈME

INFLUENCE DES SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE

SOLUTIONS FRAICHES ET SOLUTIONS STÉRILES

SUR LA CROISSANCE DU LUPIN

1° <i>Solutions de chl. de cocaïne non chauffées</i>	77
2° <i>Solutions de chl. de cocaïne chauffées à l'autoclave</i>	82
1. Solutions de chl. de cocaïne chauffées 15 minutes à 120°...	83
2. Solutions de chl. de cocaïne chauffées 2 heures à 120°....	89
3. Solutions de chl. de cocaïne chauffées 5 heures à 120°....	91
4. Solutions de chl. de cocaïne chauffées 10 heures à 120°....	95
5. Solutions de chl. de cocaïne chauffées 24 heures à 120°....	98
6. Solutions de chl. de cocaïne chauffées 48 heures à 120°....	100
7. Comparaison des résultats obtenus.....	103
3° <i>Solutions de chl. de cocaïne stérilisées et conservées à l'obscurité</i>	111
1. Solutions de chl. de cocaïne stérilisées à 120° et conservées 6 mois	111
2. Solutions de chl. de cocaïne stérilisées à 120° et conservées 14 mois	113
3. Solutions de chl. de cocaïne stérilisées à 120° et conservées 10 ans	113
4. Comparaison des résultats obtenus.....	117

CHAPITRE QUATRIÈME

INFLUENCE DE LA RÉACTION SUR LA DÉCOMPOSITION DES SOLUTIONS DE CHLORHYDRATE DE COCAÏNE. TOXICITÉ DES PRODUITS DE DÉDOUBLEMENT.

A) Influence de la concentration des ions H sur la stabilité des solutions de chl. de cocaïne	121
1° Solutions simples de chl. de cocaïne réglées à des pH divers et stérilisées 15 minutes à 120°.....	122
2° Solutions simples de chl. de cocaïne réglées à des pH divers et stérilisées une heure à 120°.....	125
3° Solutions de chl. de cocaïne faiblement tamponnées, réglées à des pH divers et stérilisées 15 minutes à 120°.....	128
4° Solutions de chl. de cocaïne en milieux tamponnés, utilisation des mélanges de Rippel.....	131
5° Comparaison des résultats obtenus.....	136
B. Influence des produits de décomposition du chl. de cocaïne sur la croissance des Lupins	138
1° Influence de l'alcool méthylique.....	140
2° Influence de la benzoylecgonine.....	142
3° Influence de l'acide benzoïque.....	146
4° Influence du benzoate de méthyle.....	149
5° Influence de l'ecgonine.....	153
6° Comparaison des résultats obtenus.....	156
CONCLUSION	158
BIBLIOGRAPHIE.....	165

